

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Efectos del factor Xa sobre el metabolismo energético y el estrés oxidativo de segmentos de arteria femoral superficial de pacientes diabéticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Saiz Jerez

Director

**Antonio José López Farré
Francisco Javier Serrano Hernando
Guillermo Moñux Ducajú**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**EFFECTOS DEL FACTOR Xa SOBRE EL METABOLISMO
ENERGÉTICO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO DE SEGMENTOS DE
ARTERIA FEMORAL SUPERFICIAL DE PACIENTES
DIABÉTICOS**

TESIS DOCTORAL

Ana María Saiz Jerez

Servicio de Angiología y Cirugía Vascular

Hospital Clínico San Carlos. Madrid

DIRECTORES DE TESIS:

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

2015



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Ana María Saiz Jerez
Título de la Tesis	Efectos del factor Xa sobre el metabolismo energético y el estrés oxidativo de segmentos de arteria femoral superficial de pacientes diabéticos.
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	
Centro al que pertenece y dirección	
D.N.I./Pasaporte	
e-mail	

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad				
Definición Objetivos				
Metodología				
Relevancia Resultados				
Discusión / Conclusiones				

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Madrid, a

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Ana María Saiz Jerez
Título de la Tesis	Efectos del factor Xa sobre el metabolismo energético y el estrés oxidativo de segmentos de arteria femoral superficial de pacientes diabéticos.
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	
Centro al que pertenece y dirección	
D.N.I./Pasaporte	
e-mail	

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad				
Definición Objetivos				
Metodología				
Relevancia Resultados				
Discusión / Conclusiones				

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Madrid, a

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Ana María Saiz Jerez
Título de la Tesis	Efectos del factor Xa sobre el metabolismo energético y el estrés oxidativo de segmentos de arteria femoral superficial de pacientes diabéticos.
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	
Centro al que pertenece y dirección	
D.N.I./Pasaporte	
e-mail	

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad				
Definición Objetivos				
Metodología				
Relevancia Resultados				
Discusión / Conclusiones				

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Madrid, a

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe de los evaluadores especialistas en la materia de la Tesis Doctoral para su admisión a trámite (Artº 4.9 b) y 4.9 c) de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007.

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Ana María Saiz Jerez
Título de la Tesis	Efectos del factor Xa sobre el metabolismo energético y el estrés oxidativo de segmentos de arteria femoral superficial de pacientes diabéticos.
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL EVALUADOR		
Nombre		
Centro		
D.N.I.		
Deberá indicarse si es interno o Externo al programa de posgrado	Interno (táchese lo que proceda)	Externo (táchese lo que proceda)

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad				
Definición Objetivos				
Metodología				
Relevancia Resultados				
Discusión / Conclusiones				

INFORME RAZONADO:

(continuar en el reverso o adjuntar cuantas hojas adicionales considere oportuno)

Madrid, a

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al responsable del Programa de Doctorado para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral (artº 4.13 de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007).



Informe de los evaluadores especialistas en la materia de la Tesis Doctoral para su admisión a trámite (Artº 4.9 b) y 4.9 c) de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007.

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Ana María Saiz Jerez
Título de la Tesis	Efectos del factor Xa sobre el metabolismo energético y el estrés oxidativo de segmentos de arteria femoral superficial de pacientes diabéticos.
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL EVALUADOR		
Nombre		
Centro		
D.N.I.		
Deberá indicarse si es interno o Externo al programa de posgrado	Interno (táchese lo que proceda)	Externo (táchese lo que proceda)

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad				
Definición Objetivos				
Metodología				
Relevancia Resultados				
Discusión / Conclusiones				

INFORME RAZONADO:

(continuar en el reverso o adjuntar cuantas hojas adicionales considere oportuno)

Madrid, a

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al responsable del Programa de Doctorado para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral (artº 4.13 de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007).

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores *Antonio José López Farré, Francisco Javier Serrano Hernando y Guillermo Moñux Ducajú* y financiada por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social [Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (RETICs) RD12 / 0042/0040], el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER) y Bayer Pharmaceuticals.

A mi Gran Familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me parece importante recalcar que no creo que las palabras puedan expresar la gran gratitud que siento hacia todas esas personas que han colaborado de alguna manera, por poco o mucho que sea, para que Esto fuera posible.

Gracias a Javier, “El Jefe”, por haber sido un modelo a seguir y del que poder aprender. Al Prof. López Farré y a todo su equipo por su gran trabajo y su ayuda, eternamente agradecida. A Willy, por su ayuda inestimable en esta tesis y durante todos estos años. A “Sariti” por...todo. Al servicio COMPLETO de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos, por su comprensión, y por haberme enseñado todos los días durante 5 años, gracias de corazón: Teresa, Luis, “Raial”, Ángel, Antonio e Isaac; a mis mayores, “El Capi”, Miguelito y “Lord Manuel”; a mis pequeños, Pablete, “Iñarra”, “Mordis” y Manuela; a “mi Lolis”, “Rosalinda”, “Mariflus”, “La Peque” y “Conchis”, y a todos los enfermeros, auxiliares y celadores de quirófano y de la 7ª planta, por ser grandes

compañeros y amigos. A mis compañeros de residencia. A “Adri-dream”.
A los Gallegos. A todos aquellos que se han cruzado en mi vida y han
aportado su granito de arena...

A mi Gran Familia, mi regalo de la vida: mis padres y mi hermana,
“Maik” & “Rous” y “Wilson Bolson”, por su apoyo incondicional, por
levantarme una y otra vez cuando me caigo, por su esfuerzo diario, su
comprensión, sus valores...nada sería posible sin vosotros, os quiero. A
“Antony”, mi segunda hermana, por estar siempre ahí. A las tías Mila e
Inma, por ser mis segundas madres. A todos mis tios y primos. A mis
“Bestas”, por formar parte de mi familia desde hace tantos años ya. A ti.

A todos los que, de alguna manera, habeis hecho Esto posible.

¡¡GRACIAS!!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA PARED ARTERIAL.....	3
1.1.1. Anatomía de la pared arterial.....	3
1.1.1.1 Capa íntima.....	3
1.1.1.2 Capa media.....	4
1.1.1.3 Capa adventicia.....	5
1.1.2. Principales tipos celulares.....	5
1.1.2.1. Células endoteliales.....	5
1.1.2.2. Células musculares lisas.....	6
1.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA PARED VASCULAR.....	6
1.2.1. Metabolismo anaerobio.....	7
1.2.1.1. Sistema de ATP-fosfocreatina.....	7
1.2.1.1. Glucólisis anaerobia.....	8
1.2.2. Metabolismo aerobio.....	8
1.2.2.1. Glucólisis.....	9
1.2.2.2. Betaoxidación de ácidos grasos.....	12
1.2.2.3. Desaminación de aminoácidos.....	15
1.2.2.4. Ciclo de Krebs.....	16
1.2.2.5. Fosforilación oxidativa.....	18
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y ARTERIOESCLEROSIS.....	19
1.3.1. Estrés oxidativo.....	19
1.3.1.1. Estrés oxidativo en la disfunción endotelial.....	20
1.3.1.2. Fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el endotelio.....	22
1.3.1.3. Fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno.....	25

1.3.1.4. Sistemas antioxidantes del organismo.....	25
1.3.2. Arteriosclerosis: formación y progresión de la placa de ateroma.....	28
1.3.2.1. Desregulación del tono vascular.....	28
1.3.2.2. Inicio de la arteriosclerosis. Adhesión leucocitaria.....	30
1.3.2.3. Migración de los leucocitos.....	31
1.3.2.4. Transformación de los leucocitos y acumulación de lípidos.....	32
1.3.2.5. Progresión de la placa de ateroma.....	33
1.3.2.6. Rotura de la placa de ateroma.....	34
1.4. DIABETES MELLITUS Y ARTERIOESCLEROSIS.....	36
1.4.1. Mecanismo de lesión vascular inducida por la hiperglucemia.....	37
1.4.2. La coagulación y la reactividad de las plaquetas en la diabetes.....	38
1.4.3. Obesidad y diabetes: resistencia a la insulina como causa de aterotrombosis...40	
1.4.4. Micro-ARN y enfermedad vascular en pacientes diabéticos.....	41
1.5. HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN.....	43
1.5.1. Hemostasia.....	43
1.5.1.1. Vasoconstricción refleja.....	44
1.5.1.2. Hemostasia primaria.....	44
1.5.1.3. Hemostasia secundaria.....	44
1.5.2. Factor X y efectos pleiotrópicos del factor Xa.....	48
1.6. RIVAROXABÁN.....	49
1.6.1. Descripción del fármaco, mecanismo de acción y ficha técnica.....	49
1.6.2. Indicaciones terapéuticas.....	50
1.6.3. Farmacodinámica y farmacocinética.....	51
1.6.3.1. Farmacodinámica.....	51
1.6.3.2. Farmacocinética.....	52

1.7. PROTEÓMICA.....	54
1.7.1. Electroforesis bidimensional.....	55
1.7.2. Espectrometría de masas.....	58
1.7.3. La <i>era proteómica</i> en la investigación vascular.....	60
2. HIPÓTESIS	63
3. OBJETIVOS	67
4. MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	73
4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	73
4.3. INCUBACIÓN DE MUESTRAS DE ARTERIA FEMORAL SUPERFICIAL....	74
4.4. DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS MEDIANTE PROTEÓMICA.....	77
4.4.1. Electroforesis bidimensional.....	77
4.4.1.1. Material utilizado.....	78
4.4.1.2. Preparación de las muestras.....	78
4.4.1.3. Primera dimensión.....	80
4.4.1.4. Segunda dimensión.....	84
4.4.1.5. Tinción.....	85
4.4.1.6. Adquisición de imágenes y análisis.....	87
4.4.2. Espectrometría de masas.....	88
4.4.2.1. Material utilizado.....	88
4.4.2.2. Método.....	88
4.4.3 Western blot.....	92
4.4.3.1. Material empleado.....	92
4.4.3.2. Preparación de las muestras.....	93
4.4.3.3. Electroforesis en gel.....	95

4.4.3.4. Transferencia y bloqueo de las proteínas.....	95
4.4.3.5. Detección de proteínas.....	98
4.4.3.6. Análisis.....	100
4.5. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO DE LACTATO.....	102
4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACONITASA.....	104
4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACETIL COENZIMA A.....	106
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	109
5. RESULTADOS	111
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS.....	113
5.2. EFECTO DE FXA EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA PARED ARTERIAL FEMORAL....	113
5.2.1. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la glucolisis aerobia y anaerobia.....	115
5.2.1.1. Determinación del contenido de lactato y de acetil-CoA.....	119
5.2.2. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la betaoxidación de ácidos grasos.....	119
5.2.3. Determinación de la actividad aconitasa: ciclo de Krebs.....	120
5.2.4. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la vía de la creatina quinasa.....	121
5.3. EFECTOS DE RIVAROXABÁN SOBRE LAS MODIFICACIONES INDUCIDAS POR FXA EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	122
5.3.1. Efecto sobre la expresión de proteínas relacionadas con la glucolisis aerobia y anaerobia.....	122
5.3.1.1. Determinación del contenido de lactato y de acetil-CoA.....	124

5.3.2. Efectos en la expresión de proteínas relacionadas con la betaoxidación de ácidos grasos.....	125
5.3.3. Efectos en la actividad aconitasa: ciclo de Krebs.....	126
5.3.4. Efectos en la expresión de proteínas relacionadas con la vía de la creatina quinasa.....	127
5.4. EFECTOS DE FXA Y RIVAROXABÁN SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	127
6. DISCUSIÓN	131
6.1. EFECTOS DEL FACTOR XA SOBRE EL METABOLISMO CELULAR.....	135
6.2. EFECTOS DEL FACTOR XA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	138
6.3 EFECTOS DE RIVALIZABAN SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR FXA.....	143
6.4. COMENTARIOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	144
7. CONCLUSIONES	147
8. BIBLIOGRAFÍA	151
9. APÉNDICES	185

1

INTRODUCCIÓN

*“Pensamientos sin contenidos son vacíos;
intuiciones sin conceptos son ciegas”*

Immanuel Kant

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA PARED ARTERIAL

1.1.1. Anatomía de la pared arterial

La pared arterial posee una estructura común en todo el árbol arterial, estando conformada por un tejido conectivo organizado en el que se incluyen células y una matriz de fibras dispuestas en tres capas: la íntima, la media y la adventicia (Fig. 1.1).

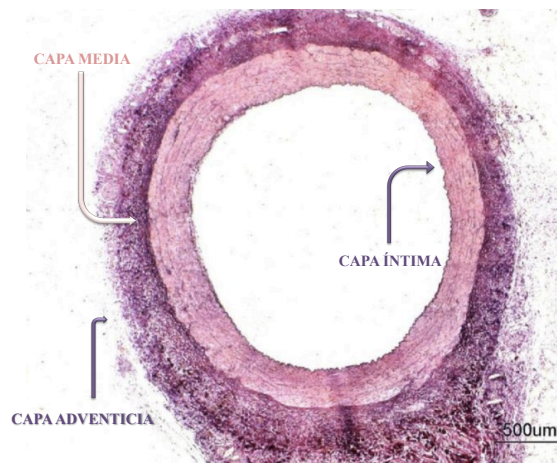


Figura 1.1. Anatomía de la pared vascular. Estructura de las capas íntima, media y adventicia.

1.1.1.1. Capa íntima

La capa íntima es la capa más interna de la arteria y se extiende desde la luz del vaso hasta la lámina elástica interna. Está compuesta por el endotelio, una capa subendotelial de tejido conjuntivo y una capa elástica fenestrada.

El endotelio está constituido por una serie de células fusiformes u ovaladas, poligonales, que se encuentran en contacto directo con el torrente sanguíneo. La superficie luminal es lisa y regular¹. Esta capa constituye un revestimiento continuo con propiedades antitrombóticas debido a la existencia de una capa de glicoproteínas o glucocáliz cubriendo dichas células endoteliales². El glucocáliz, además, reduce la

fricción del flujo sanguíneo y sirve como barrera para evitar la pérdida de líquido a través de la pared vascular. En los procesos inflamatorios el glucocálix de las células se rompe para permitir el acceso de los leucocitos y puede ser el origen de lesiones ateroscleróticas³.

Las células endoteliales (CE) se encuentran típicamente alineadas en la dirección del flujo sanguíneo y las uniones entre ellas son de gran importancia como fuerza mecánica y para la permeabilidad de la capa. De hecho, existen zonas de unión firme entre las células, la zona *occludens* (uniones herméticas) y la zona *adherens* (uniones adherentes). Estas uniones herméticas constituyen una barrera de transporte entre las células y ayudan a mantener la polaridad de la membrana².

Inmediatamente externa al endotelio se encuentra la lámina basal, que actúa como soporte mecánico y para la regeneración de las CE. Esta membrana posee un papel fundamental en la permeabilidad vascular, está involucrada en la formación del trombo y constituye un barrera para la migración celular⁴. La lámina basal está formada por glicoproteínas, moléculas de adhesión como la laminina y la fibronectina, proteoglicanos y microfibrillas de colágeno tipo IV y V⁵. La capa reticular subyacente al endotelio está compuesta por colágeno tipo I y III producido por las CE y las células musculares lisas (CML).

Durante el funcionamiento normal, la monocapa de endotelio se encuentra en un estado quiescente y las uniones célula-célula inhiben la proliferación, lo que resulta en un bajo índice mitótico y contribuye a la estabilidad e integridad de la pared vascular⁶.

1.1.1.2. Capa media

La capa media se extiende desde la lámina elástica interna hasta la adventicia. Está constituida por CML, elastina y fibras de colágeno perfectamente ordenadas⁷. Las

capas de CML forman grupos de células con una orientación similar, rodeados por una lámina basal común en íntima relación con un entramado de fibras de colágeno tipo III. Este sistema altamente integrado implica que un elemento no puede extenderse sin extensión de otro.

1.1.1.3. Capa adventicia

La adventicia se extiende desde la lámina elástica externa hasta el tejido conectivo perivascular contiguo. Esta capa contiene los *vasa vasorum* y estructuras nerviosas, que proporcionan nutrición a la adventicia y contribuyen a la regulación de la función de la CML de la capa media, respectivamente. Las fibras vasomotoras inducen vasodilatación mediante receptores β adrenérgicos y vasoconstricción mediante α adrenérgicos. El estímulo nervioso se transmite a las CML más externas mediante uniones neuromusculares y, posteriormente, la señal es transmitida a las más internas por señales eléctricas entre células adyacentes (Fig. 1.1).

1.1.2. Principales tipos celulares

1.1.2.1. Células endoteliales

La superficial arterial en contacto con el torrente sanguíneo, con la luz del vaso, y está cubierta por el endotelio, como se ha indicado anteriormente. Las CE son muy activas metabólicamente, desempeñando un importante papel en muchas funciones fisiológicas como el balance hemostático, el control de tono vasomotor, adhesión de determinados tipos celulares, permeabilidad, proliferación y la inmunidad innata y adaptativa.

Para mantener la fluidez de la sangre, las CE expresan una serie de factores que mantienen los mecanismos de formación del trombo controlados mientras se

mantenga la integridad de la pared. El carácter antitrombótico del endotelio se debe en parte a su superficie aniónica proporcionada por la alta proporción de heparán sulfato y condroitín sulfato. Las células previenen la agregación plaquetaria a través de la actividad ADP-asa de la superficie, la síntesis de prostaglandinas y la liberación de óxido nítrico (NO). El normal funcionamiento de este sistema permite un balance entre los mecanismos pro- y antitrombóticos a favor de la anticoagulación.

1.1.2.2. Células musculares lisas

La principal función de las CML consiste en mantener una presión y flujo normales en los vasos sanguíneos mediante el control del calibre de los mismos por contracción y relajación. Son responsables de la remodelación vascular, proliferación, migración y expresión proteica. Sintetizan componentes como el colágeno, la elastina, glicoproteínas y proteoglicanos, que contribuyen a la elasticidad de la pared vascular. Estos cambios ocurren en respuesta a situaciones crónicas, como la arterioesclerosis.

1.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA PARED VASCULAR

Las células obtienen energía a través de un complejo proceso de reacciones químicas. Dicha energía reside en las llamadas moléculas de alta energía, denominadas así por liberar gran cantidad de la misma con su catabolismo. Esta propiedad reside en sus enlaces altamente energéticos entre residuos de ácido fosfórico y ciertos compuestos orgánicos.

De todos estos compuestos, el adenosín trifosfato (ATP) representa el almacén de energía mas importante en las células del ser humano. Por hidrólisis y catabolizado por ATPasas, forma adenosin difosfato (ADP) y libera gran cantidad de energía que se emplea en las diferentes funciones vitales:



(donde P_i corresponde a un ion ortofosfato, inorgánico)

A su vez, el ADP puede liberar otro ion ortofosfato resultando en adenosin monofosfato (AMP). Estas reacciones químicas son bidireccionales y se comportan, en la dirección opuesta como un sistema de almacenamiento de energía.

El ATP proviene básicamente del catabolismo de las sustancias energéticas, y se produce tanto por vías anaerobias como aerobias. El catabolismo anaerobio se basa en la glucólisis anaerobia y en el metabolismo de la fosfocreatina. El aerobio comprende el catabolismo de glúcidos, grasas y proteínas.

1.2.1. Metabolismo anaerobio

1.2.1.1. Sistema de ATP-fosfocreatina, también llamado glucólisis anaerobia aláctica, representa la fuente más rápida para la obtención de ATP, a pesar de que su rendimiento energético es bajo por agotarse también rápidamente las reservas celulares de fosfocreatina.

La fosfocreatina es otro de los compuestos de almacenamiento de alta energía, gracias a su enlace entre el fosfato y la creatina. La enzima creatinina quinasa (CK) o creatininfosfokinasa (CPK) rompe este enlace liberando un grupo fosfato que se une a ADP para formar ATP, de forma reversible:



La CPK es una enzima dimérica compuesta por dos tipos de subunidades monoméricas, M (muscular) y B (cerebral) que se combinan para formar tres isoenzimas creatina quinasa distintas: CK-1 (BB), CK-2 (MB) y CK-3 (MM). La principal proporción de la actividad total de la CPK se encuentra en los músculos esqueléticos y ésta es predominantemente la isoforma CK-3. Otros tejidos con unos

niveles de creatina quinasa relativamente elevados incluyen el miocardio, del cual aproximadamente el 40% es la isoforma CK-2, el tracto gastrointestinal y el cerebro, en el que predomina la isoforma CK-1.

1.2.1.2. Glucolisis anaerobia, que se expondrá más tarde en el contexto de la glucolisis.

1.2.2. Metabolismo aerobio

Este proceso podría dividirse en tres etapas. En la primera, los carbonos de macromoléculas dan lugar a moléculas de acetil-CoA de dos carbonos, e incluye la glucolisis, las vías catabólicas de aminoácidos (p. ej. desaminación oxidativa) y la beta oxidación de ácidos grasos. La segunda de estas etapas correspondería al ciclo de Krebs y la tercera a la fosforilación oxidativa, en la cual el poder reductor (NADH y FADH₂) generado se emplea para la síntesis de ATP según la teoría del acoplamiento quimiosmótico (figura 1.2).

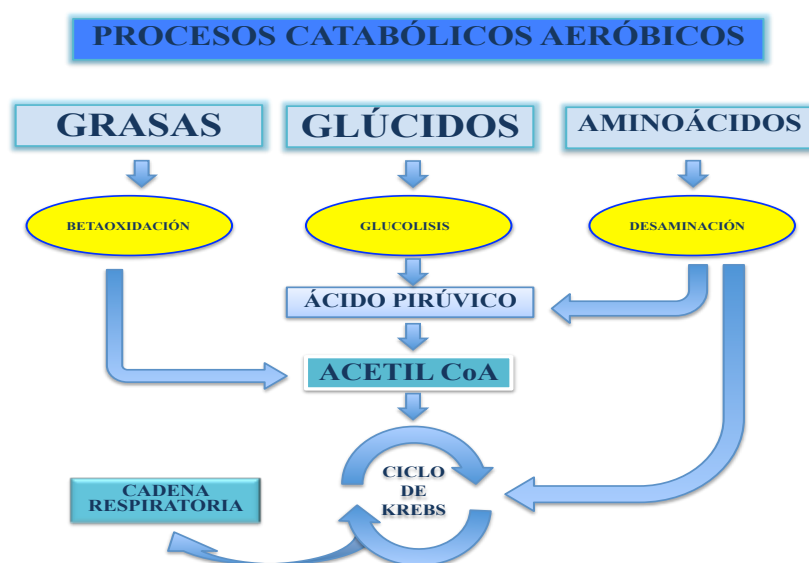


Figura 1.2. Catabolismo aerobio.

1.2.2.1. Glucolisis

Entre estos complejos procesos interrelacionados, la glucolisis constituye la principal fuente de energía celular a través de la oxidación de la glucosa en el citosol, pudiendo formar parte tanto de las vías aerobias como de las anaerobias (Fig. 1.2) (de hecho, en condiciones fisiológicas, más del 80% del ATP se produce mediante la conversión de glucosa en lactato)^{8,9,10}.

Esta ruta universal consta de diez reacciones agrupadas en dos fases^{11,12}:

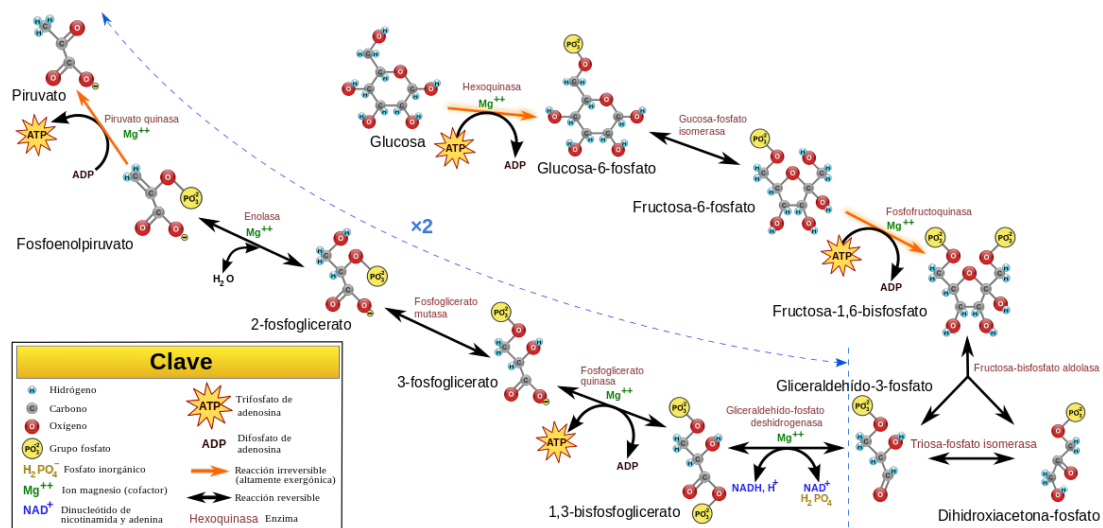


Figura 1.3. Esquema de las diez reacciones que constituyen la vía glucolítica, con los sustratos, productos y enzimas catalizadoras. Fuente: www.wikipedia.es.

1. Fase de gasto o aporte energético

- **Reacción 1. Fosforilación de la glucosa.** El primer paso de la glucolisis consiste en la activación de la glucosa mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP por la enzima hexoquinasa. Como consecuencia se forma la glucosa-6-fosfato (G6P).

- Reacción 2. *Isomerización de la glucosa-6-fosfato*. En esta fase la G6P se isomeriza a fructosa-6-fosfato (F6P) mediante una reacción de cuatro pasos, que implica la apertura del anillo de la G6P y posterior ciclado en la forma furanosa (F6P).
- Reacción 3. *Fosforilación de la fructosa-6-fosfato*. La fosfofructoquinasa-1 fosforila el carbono 1 de la F6P (obteniendo la fructosa 1,6-bifosfato), constituyendo éste el principal punto de control de la glucólisis debido a su irreversibilidad.
- Reacción 4. *Fragmentación de la fructosa 1,6-bifosfato*. Una enzima clave en la vía glucolítica es la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, que escinde la fructosa 1,6-bifosfato en dos triosas fosfato: la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P).
- Reacción 5. *Isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato*. Otra enzima fundamental en el proceso de la glucólisis es la implicada en esta reacción: la triosa fosfato isomerasa (TPI). La TPI representa un importante papel en la producción de energía por la célula. Su función es isomerizar la DHAP en otra molécula de G3P.

2. Fase de obtención de energía

- Reacción 6. *Oxidación y fosforilación del D-gliceraldehído-3-fosfato*. Esta reacción es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando el G3P mediante la utilización de NAD^+ para añadir un ion fosfato a la molécula y obteniendo el 1,3-bifosfoglicerato.
- Reacción 7. *Cesión de un grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato al ADP*. En este paso la enzima fosfoglicerato quinasa transfiere el grupo fosfato del

1,3-bifosfoglicerato a una molécula de ADP, generando así la primera molécula de ATP de la vía (y el 3-fosfoglicerato).

- Reacción 8. *Isomerización del 3-fosfoglicerato*. La enzima fosfoglicerato mutasa isomeriza el 3-fosfoglicerato procedente de la reacción anterior, dando el 2-fosfoglicerato.
- Reacción 9. *Deshidratación del 2-fosfoglicerato*. En este paso se produce una pérdida de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato para dar lugar al ácido fosfoenolpirúvico (PEP). La enzima encargada de catalizar esta reacción es la enolasa.
- Reacción 10. *Cesión de un grupo fosfato al ADP*. La última reacción de la glucólisis es catalizada por la piruvato quinasa y da lugar al piruvato por la cesión de un grupo fosfato del PEP al ADP.

El anión piruvato es un compuesto orgánico clave en el metabolismo energético y puede seguir dos caminos:

1, si no hay suficiente cantidad de oxígeno disponible, el piruvato sigue una ruta anaeróbica catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH), la fermentación, que culmina en la producción de ácido láctico junto con la oxidación de NADH (NAD⁺). Es la llamada glucólisis anaerobia, que se mencionó previamente¹³.

2, si hay suficiente suministro de oxígeno, el ácido pirúvico es descarboxilado en la matriz de la mitocondria por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa rindiendo CO₂ y acetil coenzima A, que es el inicio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

1.2.2.2. Betaoxidación de ácidos grasos¹².

La oxidación de los ácidos grasos es un mecanismo clave para la obtención de energía metabólica por parte de los organismos aeróbicos y se producen en el interior de la mitocondria. La β -oxidación de los ácidos grasos es el principal proceso productor de energía, pero no el único (menos frecuentes son la α -oxidación, la ω -oxidación o la oxidación peroxisómica).

- **Activación de ácidos grasos:** una serie de acil-CoA ligasas, específicas para los diferentes ácidos grasos, catalizan la formación de los conjugados tioésteres de acilo con la coenzima CoA en 2 pasos: primero se produce acil adenilato por la activación del grupo carboxilo del ácido por el ATP con la consiguiente liberación de pirofosfato; y después se forma el derivado acil-CoA tras ser atacado el grupo carboxilo por el grupo tiol de la CoA, desplazando al AMP.

- **Transporte a la matriz mitocondrial:** posteriormente, debe usarse un transportador, la carnitina, para traslocar las moléculas de acil-CoA al interior de la matriz mitocondrial, ya que la membrana mitocondrial interna es impermeable a los acil-CoA.

La carnitina, también reconocida como vitamina B11, es un aminoácido que participa en el circuito vascular reduciendo niveles de triglicéridos y colesterol en sangre. Se produce naturalmente en el hígado a partir de los aminoácidos L-metionina y la L-lisina. La carnitina se encarga de llevar los grupos acilo al interior de la matriz mitocondrial por medio del siguiente mecanismo:

La enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI) (también llamada carnitina aciltransferasa I, de forma genérica para todos los ácidos grasos) une una molécula de acil-CoA a la carnitina originando la acilcarnitina.

La translocasa, una proteína transportadora de la membrana mitocondrial interna, transloca la acilcarnitina a la matriz mitocondrial. La acil-CoA se regenera por la carnitina palmitoiltransferasa II. La carnitina se devuelve al espacio intermembrana por la proteína transportadora y reacciona con otro acil-CoA (figura 1.4).

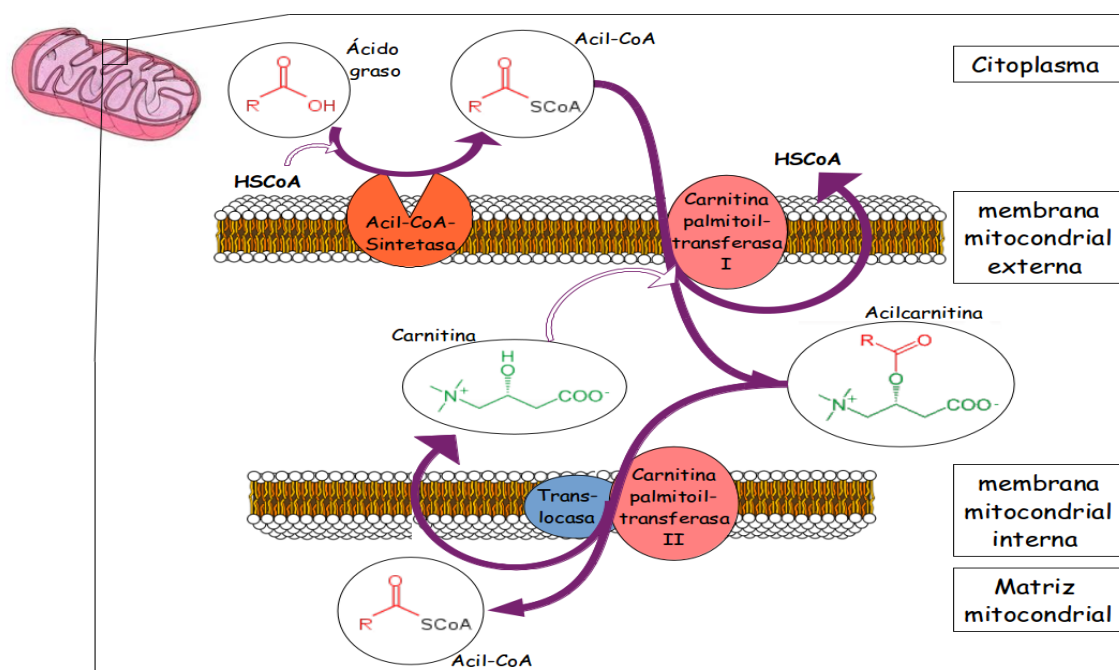


Figura 1.4. Catabolismo de ácidos grasos. Transporte hacia el interior de la mitocondria. La β -oxidación consiste en 4 pasos cuyos productos finales son una molécula de acetil-CoA que ingresa en el ciclo de Krebs como parte de la respiración celular, y una molécula de acil-CoA que ahora es 2 átomos de carbono más corta que antes. Además se producen una molécula de FADH₂ y una de NADH/H⁺ que ingresan en la cadena respiratoria para obtención directa de ATP. El ácido graso recorre estas 4 reacciones tantas veces que sea necesario; es decir hasta que se descompone por completo en forma de moléculas acetil-CoA. En cada ciclo pierde un par de átomos de carbono, por lo que depende del largo de la cadena alifática del ácido graso cuántos acetil-CoA se obtienen a través de él. Fuente: www.medicinabc.com

- La β -oxidación.

Es una secuencia de cuatro reacciones en que se separan fragmentos de dos carbonos desde el extremo carboxilo ($-COOH$) de la molécula; estas cuatro reacciones se repiten hasta la degradación completa de la cadena (figura 1.5).

1ª: deshidrogenización inicial, catabolizada por la enzima acilCoA deshidrogenasa, que deshidrogena entre el carbono alfa y el beta, para dar como producto una trans- Δ^2 -enoilCoA.

2ª y 3ª: hidratación y deshidrogenización, catabolizada por las enzimas enoil-CoA hidratasa y la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y dando como producto L-beta-hidroxiacil-CoA y beta-ceto-acil-CoA respectivamente.

4ª: fragmentación tiolítica, catabolizada por la enzima beta-cetotiolasa, y consiste en un ataque del azufre tiol nucleófilo de la CoA sobre el carbono ceto, pobre en electrones, de la 3-cetoacilCoA, con fragmentación del enlace alfa-beta y liberación de acetil-CoA y acil-CoA.

La acetil-CoA resultante continúa su metabolismo en el ciclo de Krebs, y la acil-CoA inicia un nuevo ciclo de oxidación.

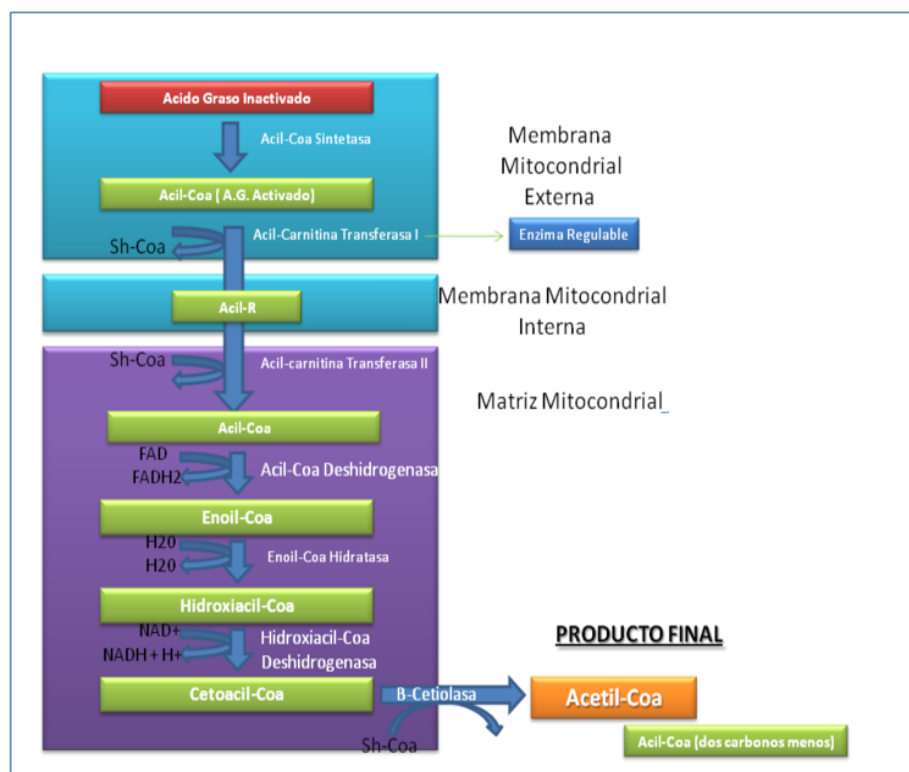


Figura 1.5. Betaoxidación de ácidos grasos previo transporte al interior mitocondrial. Fuente:

<http://biovitonet.wikispaces.com/Beta-oxidación>.

1.2.2.3. Desaminación de aminoácidos^{12,14}.

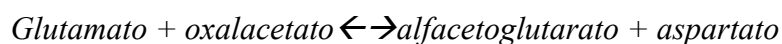
Además de su papel como unidades monoméricas de proteína, los aminoácidos (aa) son metabolitos energéticos y precursores de muchos compuestos de importancia biológica que contienen nitrógeno (grupo hemo, aminas, nucleótidos, etc.). Los aminoácidos se clasifican en 2 grupos: esenciales, que deben ser incorporados a través de la dieta, y no esenciales, que el organismo los puede sintetizar. El exceso de aminoácidos de la dieta no se almacena ni se excreta, sino que el catabolismo de los aminoácidos excedentes supone que el grupo α -amino se convierta en urea para su excreción, mientras que los esqueletos carbonados se transformen a Acetil-CoA, piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs y la energía consiguiente de su oxidación.

Las tres etapas más comunes en la degradación de los aminoácidos son:

- **1º:** desaminación. La mayoría de los aminoácidos se desaminan por medio de transaminación, la transferencia de su grupo amino a un α -cetocarboxílico que produce el α -cetocarboxílico del aminoácido original y un nuevo aminoácido, en reacciones catalizadas por las aminotransferasas (también llamadas transaminasas). El α -cetoglutarato es el aceptor predominante de grupo amino y se convierte en glutamato como aminoácido nuevo:

$$aa + \alpha\text{-cetoglutarato} \rightleftharpoons \alpha\text{-cetocarboxílico} + \text{glutamato}$$

A su vez, el grupo amino del glutamato se transfiere al oxalacetato en una segunda reacción de transaminación para generar aspartato:



Por supuesto, la transaminación no produce una desaminación neta. Esta última se produce en gran medida por medio de la desaminación oxidativa del glutamato mediante la glutamato deshidrogenasa (GDH), para generar amonio. La reacción requiere NAD^+ o NADP^+ como agente oxidante y regenera el α -cetoglutarato para su utilización en reacciones de transaminación adicionales.

- 2º: conversión de los esqueletos carbonados de los aminoácidos (los alfacetoácidos producidos por desaminación) en intermediarios metabólicos comunes (Acetil-CoA, piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs).

- 3º: incorporación del amonio y los átomos de nitrógeno a la urea para su excreción.

1.2.2.4. Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs (también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos) es una ruta metabólica que forma parte de la respiración celular en todas las células aeróbicas y que se realiza en la matriz mitocondrial. Como se mencionó previamente, en organismos aeróbicos, el ciclo de Krebs es parte de la vía catabólica que realiza la oxidación de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos hasta producir CO_2 , liberando energía en forma utilizable (poder reductor y GTP). El ciclo de Krebs también proporciona precursores para muchas biomoléculas, como ciertos aminoácidos. Por ello se considera una vía anfibólica, es decir, catabólica y anabólica al mismo tiempo (figura 1.6)^{15,16}.

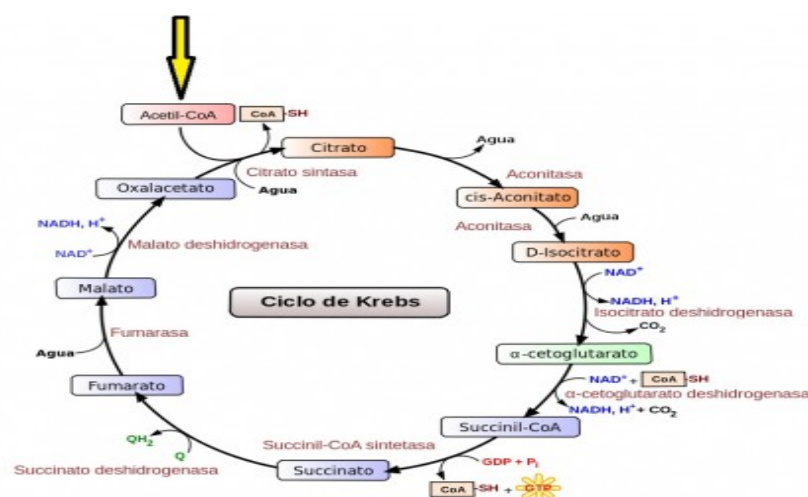


Figura 1.6. Ciclo de Krebs. Fuente: <http://biologia.laguia2000.com/bioquimica/el-ciclo-de-krebs-paso-a-paso>

Podríamos dividirlo en 8 etapas:

1. Citrato sintasa: el acetil (grupo de 2 carbonos), procedente de la degradación de moléculas complejas se une a la Coenzima A para entrar al ciclo. El acetil-CoA transfiere el acetil al oxalacetato (molécula de 4 carbonos) para formar una molécula de ácido cítrico (6 carbonos, 6C). Este paso está catalizado por la citrato sintasa y se consume una molécula de agua en el proceso. El citrato que se forma es capaz de impedir la actividad de la citrato sintasa, por lo que hasta que no se acaba el citrato no continúa generándose.

2. A continuación el citrato se convierte en cis-Aconitato (la misma enzima catalizará el cambio a isocitrato) mediante la aconitasa. El isocitrato (6 carbonos) es una forma isomérica del citrato, pero sirve como sustrato para la siguiente enzima.

3. La isocitrato deshidrogenasa oxidará el isocitrato a oxoglutarato (6C). En este proceso se genera poder reductor, que será almacenado en un NAD^+ que se reducirá a NADH. Esta enzima transforma el isocitrato en oxalsuccinato y este cambio modifica la electronegatividad de la molécula, produciéndose una descarboxilación; la rotura de un grupo carboxilo (se elimina en forma de CO_2) al perder este carbono se denomina alfa-cetoglutarato o oxoglutarato (con 5 carbonos).

4. La a-cetoglutarato deshidrogenasa transformará el a-cetoglutarato en succinil-CoA (el succinil tiene 4 carbonos) mediante una descarboxilación oxidativa, se pierde otro grupo carboxilo. Este proceso se lleva a cabo en tres pasos, realizados por 3 subunidades de la enzima. En este proceso se genera mucha energía, parte de ella servirá para unir una molécula de CoA y el resto se almacena en forma de poder reductor en NAD^+ , que se convierte en NADH.

5. La succinil-CoA será hidrolizada por la succinil-CoA sintetasa para dar succinil. Esta enzima rompe el enlace entre la coenzima A y el succil. El cosustrato de

esta reacción es el GDP (guanín difosfato) que aprovechará la energía de la reacción para unir un fosforo inorgánico (Pi) y formar GTP.

6. El succinato (4C) es transformado en fumarato (4C) por la succinato deshidrogenasa. El poder reductor que se genera se almacena en la FADH₂ que almacena menor energía que el NAD⁺, puesto que esta oxidación no es tan energética.

7. El fumarato mediante la fumarasa es convertido en L-malato mediante la hidratación con un grupo –OH desde una molécula de agua.

8. El malato se oxida por la malato deshidrogenasa dando oxalacetato, generando una última molécula de NADH. Al final de este paso obtenemos nuevamente oxalacetato (4C), que puede ser utilizado por la primera enzima del ciclo para volver a generar energía.

1.2.2.5. Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es el proceso mediante el cual se oxidan las moléculas de alimento de rutas como el ciclo de Krebs, transfiriendo sus electrones al O₂, y la energía resultante es aprovechada en forma de síntesis de ATP.

Como se detalló previamente, las moléculas derivadas del catabolismo de glucosa, ácidos grasos y proteínas son metabolizadas para producir acetil-CoA como un intermediario rico en energía. La oxidación de acetil-CoA en la matriz mitocondrial está acoplada a la reducción de una molécula transportadora como NAD⁺ y FAD¹⁷. Los transportadores traspasan electrones a la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna, que luego los traspasan a otras proteínas en la cadena transportadora. La energía disponible en los electrones se usa para bombear protones desde la matriz, a través de la membrana mitocondrial interna, guardando energía en forma de un gradiente electroquímico transmembrana¹⁸. Los protones se devuelven a

través de la membrana interna, mediante la enzima ATP-sintasa. El flujo de protones hace que la subunidad menor gire, lo que produce que el sitio activo fosforile al adenosín difosfato (ADP) y lo convierta en ATP¹⁹.

Los electrones y protones en la última bomba proteica de la cadena transportadora son llevados al oxígeno (O₂) para formar agua (H₂O).

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y ARTERIOESCLEROSIS.

1.3.1. Estrés oxidativo.

La génesis de la aterosclerosis involucra mecanismos sinérgicos que incluyen estrés oxidativo (EO), disfunción endotelial (DE), inflamación vascular y, en menor medida, etiologías de naturaleza intrauterina e infecciosa²⁰.

El EO se origina a partir del desbalance entre los radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (del inglés, ROS) generados en los procesos metabólicos del organismo y la actividad de los sistemas antioxidantes (AOX)²¹: la generación de ROS y RL se incrementa, y los mecanismos AOX no son eficientes para inhibirlos.

Los RL son moléculas que contienen en su último orbital un electrón desapareado mientras que los ROS son moléculas que contienen oxígeno en su estructura y pueden o no tener electrones desapareados. Ambos tipos de moléculas actúan en varios procesos como son la fecundación, la activación de genes, el metabolismo peroxisomal de ácidos grasos en donde se forma peróxido de hidrógeno (H₂O₂), como subproducto en los procesos de defensa inmunológica, en los procesos de oxidación del citocromo P450, etc²². Sin embargo, debido a la naturaleza altamente reactiva de los ROS y los RL, tienen la propiedad de iniciar reacciones en cadena para adquirir un electrón con el fin de estabilizarse. Las moléculas a las que les es sustraído

un electrón se convierten a su vez en RL y pueden reaccionar con diversas biomoléculas como ADN, proteínas y lípidos²³.

ROS y RL se producen de manera natural en los organismos aerobios por el uso del oxígeno en la mitocondria como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria; el oxígeno celular es aprovechado de un 97-98% para la síntesis de agua y del 2 al 3% restante genera continuamente ROS (H_2O_2 y el ion superóxido, O_2^-). Otros agentes oxidantes generados de manera endógena son el peroxinitrito (OONO^-), el ácido hipocloroso (HOCl), el radical hidroxilo (OH^-), los aldehídos, peróxidos y radicales lipídicos y óxidos de nitrógeno²⁴.

El EO contribuye al proceso de envejecimiento, debido a que con la edad la generación de ROS se incrementa y disminuye la eficacia de los sistemas AOX, propiciando la progresión y acumulación del daño²⁵.

El EO y la inflamación están involucradas en patologías cardiovasculares (aterosclerosis, hipertensión y fallo cardíaco), renales (insuficiencia renal aguda), pulmonares (lesión pulmonar aguda y asma), y desórdenes del sueño como la apnea.

1.3.1.1. Estrés oxidativo en la disfunción endotelial

La disfunción endotelial se considera una de las primeras manifestaciones de las enfermedades cardiovasculares, en especial la arteriosclerosis. Como se ha mencionado con anterioridad, el endotelio no es una mera capa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, sino una estructura altamente especializada, metabólicamente activa, que regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células de la propia pared, ejerciendo un papel clave como sensor y transmisor de señales. Diversos factores pueden producir una modificación en las funciones del endotelio y provocar lo que se ha denominado disfunción endotelial, que

puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas producidas por el propio endotelio^{26,27,28}.

Entre estos factores, el EO es un proceso clave en el desarrollo de la aterosclerosis por disfunción endotelial^{24,29}: bajo una situación de estrés oxidativo, la vida media del NO se reduce y la formación del anión peroxinitrito induce una peroxidación lipídica, disrupción de las membranas celulares, la señalización y la supervivencia celular^{30,31}.

El endotelio permite un tráfico selectivo de macromoléculas, pero cuando se produce este desequilibrio se observa una pérdida progresiva para controlar el paso de determinadas macromoléculas hacia el interior, como el fibrinógeno y las proteínas de baja densidad (LDL). Este incremento en la permeabilidad parece vinculado con un proceso de contracción celular mediado por calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular³².

El paso de LDL a través del endotelio se produce a favor de gradiente de concentración mediante un proceso de transcitosis no mediado por receptor³³. Se cree que la desorganización de las fibras de actina y la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina es el efecto que facilita este tránsito³⁴.

La disfunción endotelial implica una alteración profunda de su patrón de expresión génica, lo que conlleva la inducción de genes que, en condiciones fisiológicas, estarían reprimidos y la inhibición de otros expresados en condiciones normales³². En este sentido, se produce una diferente modulación de la expresión proteica de las células endoteliales.

1.3.1.2. Fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el endotelio

De manera endógena las principales enzimas oxidantes de las células son: la NADH oxidasa, la xantina oxidoreductasa (XOR), la ciclooxigenasa (COX), la óxido nítrico sintasa (NOS) y las hemoproteínas (hemo y hematina), entre otras.

- **La NADH/NADPH oxidasa** es la principal fuente de ROS en la adventicia vascular y se expresa en la membrana de células endoteliales, en células del músculo liso vascular y sanguíneas: neutrófilos, monocitos, macrófagos y fibroblastos, aunque su acción es variable en cada uno de ellos.

La NADH/NADPH oxidasa está compuesta de 2 subunidades: p22phox, que es una subunidad no glicosilada; y la gp91phox que es una unidad glicosilada y se encuentra relacionada directamente con la disfunción endotelial y la hipertensión renovascular³⁵. Esta enzima genera O_2^- y utiliza como sustrato al dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o al dinucleótido fosforilado de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) como donador de electrones. La actividad de las NADH/NADPH está regulada por citoquinas y hormonas tisulares. Estos factores están asociados con el grosor de la íntima media y por tanto al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, por lo que la actividad de la NADPH representa un potencial marcador temprano de aterosclerosis³⁶.

Las células de músculo liso vascular presentan un aumento de la actividad de NADPH oxidasa en presencia de angiotensina-II y TNF- α , resultando en una elevación de ROS. El aumento de las ROS, principalmente O_2^- , en la vasculatura supone el comienzo de una disfunción endotelial a expensas de una disminución de la

biodisponibilidad de NO, de prostaciclina y de la activación de endotelina-1³⁷.

- Otro mecanismo recalable es el de la **xantina oxidoreductasa (XOR)**, que es una molibdoflavoenzima responsable de catabolismo de las purinas, que cataliza la oxidación de hipoxantina en xantina y de xantina en ácido úrico y que, in vivo, posee tanto actividad de anti-oxidante (principalmente en el plasma) como pro-oxidante (principalmente en el interior celular)³⁸.

En los mamíferos, XOR está presente en dos formas interconvertibles³⁹: xantina deshidrogenasa, que prefiere NAD + como aceptor de electrones, y la xantina oxidasa, que transfiere los electrones directamente al oxígeno molecular, con la producción de ROS (anión superóxido y peróxido de hidrógeno). La tasa de producción de estos dos ROS depende de la tensión de O₂, el pH y la concentración de purinas, estando favorecida cuando los niveles de O₂ y pH se reducen, como ocurre bajo condiciones de isquemia y / o hipoxia⁴⁰.

En la hipercolesterolemia temprana, existe una elevación en la producción de O₂⁻ derivado de la xantina oxidasa. Su inhibición mejora la relajación vascular dependiente del endotelio⁴¹.

- **La NOS endotelial (eNOS)** es otra fuente de producción de O₂⁻, cataliza la oxidación de L- arginina a citrulina en presencia de calmodulina para formar NO. La eNOS está formada por dos monómeros que presentan un dominio reductasa para enlazar 3 de sus 4 cofactores: el NADPH, la flavina mononucleótido, y la flavina adenina dinucleótido; su último cofactor, la tetrahidrobiopterina está unida a un dominio oxigenasa⁴². En ausencia de sus cofactores, los electrones donados por el NADPH no fluyen del dominio oxigenasa al dominio reductasa, y se produce O₂⁻. Además, la tetrahidrobiopterina puede generar de manera no enzimática O₂⁻, lo que limita la capacidad de la eNOS para producir NO libre en ausencia de superóxido dismutasa

(SOD). Estudios con cultivos de células endoteliales con LDL muestran el incremento en la producción de O_2^- de forma dependiente de la eNOS.

El NO presenta diversas funciones biológicas, la principal es la modulación del tono vascular por su acción vasodilatadora, de esta manera protege a los vasos sanguíneos de la agresión por la turbulencia de la sangre. También inhibe la agregación plaquetaria, la proliferación de las células musculares lisas y la expresión de moléculas de adhesión. Su síntesis se estimula por sustancias químicas como la acetilcolina, las catecolaminas, la vasopresina, la histamina, la bradicinina e incluso por las endotelinas. También se estimula por estímulos físicos como la fuerza de rozamiento de la sangre en el endotelio en el incremento del gasto cardíaco y la elevación de la presión arterial. El NO, al tener un electrón desapareado puede actuar como RL, reaccionando rápidamente con el oxígeno y otras ROS, principalmente el O_2^- , y forma $OONO^-$ a una velocidad 3 veces más rápida que la dismutación de O_2^- en agua y oxígeno por la SOD, implicando una sobreproducción de O_2^- en el endotelio que inhibe las funciones fisiológicas del NO. Aunque el $OONO^-$ actúa como vasodilatador, también es un oxidante fuerte y a un pH ácido se protona y es más estable que sus generadores, después por ruptura hemolítica produce OH^- y dióxido de nitrógeno, que son radicales fuertemente oxidantes. Se cree que las reacciones de oxidación inducidas por el $OONO^-$ como la modificación de grupos hierro-sulfuro, zinc, proteínas con grupos tioles y lípidos de membrana están implicadas en diversas patologías, como la arterioesclerosis⁴³.

- Otro ejemplo es la **COX** (también llamada prostaglandina-endoperoxidasa sintasa), que convierte al ácido araquidónico en endoperoxido cíclico (PGG₂) por introducción de oxígeno molecular y formación de ciclopentano. A partir de PGG₂ se forma el segundo endoperoxido cíclico (PGH₂) por acción de la enzima peroxidasa. La PGH₂ conserva su función de endoperoxido (-O-O-) y es el precursor inmediato de

todas las prostaglandinas de la serie 2, las prostaciclina y los tromboxanos. Como producto de esta reacción se originan agentes oxidantes que regulan la acción de la ciclooxigenasa y además poseen importancia en el proceso inflamatorio^{12,44,45}.

- Las **hemoproteínas** desempeñan diversas funciones como el transporte de oxígeno y de electrones, principalmente debido al grupo hemo-Fe de su estructura, que permite reacciones redox. Regularmente, el hemo se degrada enzimáticamente a biliverdina y después a CO y Fe; sin embargo, en una degradación no enzimática producida por oxígeno se generan múltiples especies de ROS en el eritrocito⁴⁶. Klouche et al²³ estudiaron el mecanismo de generación de hemo-citotoxicidad y el efecto de las terapias antioxidantes. Lo realizaron evaluando tres grupos de LDL expuestas a diferentes posibles generadores de ROS; el Fe, el grupo hemo y la protoporfirina con y sin adición de peróxidos; observaron que el Fe y la protoporfirina no causan por sí solos un efecto oxidativo en las LDL, sino que es una interacción entre el grupo hemo y las LDL.

1.3.1.3. Fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno

El organismo puede estar expuesto a ROS generadas en el metabolismo y el medio ambiente. En el ambiente se mencionan como principales fuentes generadoras la energía radiante o radiación ionizante (radioterapia y luz UV), el tabaquismo, la exposición a tóxicos (CCl₄, dioxinas, estreptozotocina), entre otros^{47,48}.

1.3.1.4. Sistemas antioxidantes del organismo

Fisiológicamente y en condiciones normales, se producen RL y ROS; sin embargo, su efecto nocivo se mantiene contrarrestado por el organismo mediante la acción de los AOX, tanto endógenos, exógenos, enzimáticos y no enzimáticos⁴⁹. Al

hallarse presentes a bajas concentraciones con respecto a las del sustrato oxidable (biomoléculas) retardan o previenen su oxidación.

Los antioxidantes celulares mejor estudiados son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX). Antioxidantes enzimáticos menos estudiados (pero probablemente muy importantes) son la peroxirredoxina y la sulfirredoxina. Otros enzimas que tienen propiedades antioxidantes (aunque esta no es su función primordial) incluyen la glutatión S-transferasa, la aldehído deshidrogenasa y la paraoxonasa.

Aunque la **GPX** y la **CAT** eliminan en H_2O_2 , poseen diferencias en su afinidad, alterando sus eficacias. Mientras que la GPX es eficiente a bajas concentraciones de H_2O_2 , la CAT lo es a altas concentraciones y presenta una alta capacidad de reacción aunque tiene una baja afinidad por el sustrato; cuando la CAT presenta una actividad deficiente, ocurre una acumulación de H_2O_2^- y OH^- . Estudios en ratones carentes de CAT y que simultáneamente se les restringió la vitamina E mostraron una elevada incidencia de tumores de mama⁴⁹. A diferencia de la enzima SOD, la CAT se sintetiza constantemente sin importar la demanda fisiológica o la concentración de un sustrato, y por lo tanto no se puede inducir por agentes oxidantes o citoquinas.

Existen tres tipos de **SOD** de acuerdo al ion metálico que actúa como su cofactor y su ubicación celular: Zn/Cu-SOD intracelular, Zn/Cu-SOD extracelular y Mn- SOD mitocondrial. La función de la Mn-SOD es de las más importantes dada su localización en la mitocondria donde la producción de RL es alta. Estudios en ratones mostraron que de los 3 tipos de SOD, la carencia de Mn-SOD puede inducir acidosis metabólica severa, degeneración de neuronas y de los miocitos cardiacos, y muerte⁵⁰.

Las **peroxirredoxinas** son una ubicua familia de peroxidases antioxidantes que controlan los niveles de peróxido inducido por citoquinas, y en consecuencia, median en la transducción de señales en células de mamíferos⁵¹; mientras que la sulfirredoxina se encuentra involucrada en el metabolismo antioxidante por medio de la reactivación de las peroxirredoxinas cuando estas se encuentran inhibidas por una sobreoxidación, las peroxirredoxinas son un grupo de peroxidases⁵².

Las **glutathione S-transferases** pertenecen a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutathione reducido ó GSH (γ -Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. En mamíferos estas isoenzimas (GSTs) existen como homodímeros o como heterodímeros, tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero. Se clasifican en siete familias (alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta y zeta) que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico^{53,54,55}.

Las **aldehído deshidrogenasa** son una súper familia de enzimas que catalizan la eliminación de aldehídos en el cuerpo. Diecinueve genes de las ALDH han sido mapeados en el genoma humano, y por lo menos cinco isoenzimas residen y ejercen su función en la mitocondria formando parte del delicado equilibrio redox, entre otras funciones⁵⁶. De hecho, la ALDH2 mitocondrial ha surgido como una enzima clave como factor cardioprotector^{57,58,59}.

La **paraoxonasa**, en concreto la paraoxonasa-1 (PON1), es una enzima dependiente de calcio con actividades de esterasa y lactonasa. Aún sin conocerse su papel fisiológico, se la describió por su capacidad de hidrolizar derivados de

compuestos organofosfato⁶⁰; los mismos que inhiben la acción de la acetil colinesterasa⁶¹, causando síndrome colinérgico y polineuropatía crónica. Los sustratos de paraoxonasa-1 (PON1) son tri-ésteres del ácido fosfórico⁶² como paraoxón y diazoxón, metabolitos de los insecticidas altamente tóxicos paratión y diazinón, respectivamente. En 1991 Mackness y colaboradores⁶³ sugirieron que la enzima podría ser capaz de impedir o limitar la oxidación de las LDL. Ese fue el primer informe que le adjudicó a la PON1 capacidad antioxidante, tornándose en un punto nodal para entender la importancia clínica de esta enzima, dada la relación entre el estrés oxidativo, la oxidación del LDL y la aterosclerosis. En la actualidad es creciente el interés en el conocimiento del papel que juega esta enzima en la protección del desarrollo de la aterosclerosis.

1.3.2. Arteriosclerosis: formación y progresión de la placa de ateroma

1.3.2.1. Desregulación del tono vascular

Como se ha objetivado en pacientes con diversos factores de riesgo cardiovascular, la primera manifestación de la disfunción endotelial es la disminución de su capacidad vasodilatadora⁶⁴, en la que el EO y el NO desempeñan un papel fundamental, como se explicó previamente. Se piensa que la oxidación de moléculas de LDL puede ser modulada por el NO y sus productos. A su vez, las LDL_{ox} pueden inhibir la producción de NO por diferentes mecanismos: 1, disminución de la actividad de la eNOS, como se ha demostrado en estudios *in vitro*⁶⁵; 2, aumento de la degradación del NO⁶⁶; 3, aumento de la fracción de eNOS unida a caveolina (por tanto, insensible a la regulación por calcio-calmodulina)⁶⁷. La importancia *in vivo* de estos mecanismos de disminución del NO se demuestra por la menor expresión de la eNOS en lesiones arterioscleróticas⁶⁸.

Estas LDL_{ox} parecen ser uno de los factores proinflamatorios más importantes durante los procesos arterioscleróticos⁶⁹, al implicar la aparición de peróxidos y otra serie de radicales libres. Las LDL_{ox} junto con aldehídos de cadena pequeña y citoquinas proinflamatorias como la IL-1 son capaces de producir una alteración profunda en el patrón de expresión génica de las CE, lo que conlleva la inducción de genes que en condiciones fisiológicas estarían inhibidos (Fig. 1.7). En los últimos años se han acumulado evidencias que apoyan la importancia del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) en la inmunidad y la inflamación, al intervenir en la alteración del patrón de expresión génica inducida por las citadas moléculas proinflamatorias^{70,71}, ya que interviene en la transcripción de genes que codifican para multitud de moléculas (interleuquinas, IL-1, IL-6 e IL-8, el TNF- α , factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, varias moléculas de adhesión, ICAM-1, VCAM-1⁷², antígenos de clase II y anticuerpos)^{73,74}.

El NO, sintetizado por el endotelio, posee un efecto antiagregante plaquetario, vasodilatador, inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante e inhibidor de la expresión de las CAM (IL-1 e interferón γ [INF- γ]⁷⁵ y de la adhesión de monocitos a la pared arterial, por lo que es una de las moléculas que puede clasificarse como ateroprotectora. A nivel transcripcional, el NO induce la expresión de I κ B, el inhibidor endógeno de NF- κ B, inhibiendo los efectos proinflamatorios de NF- κ B. Por ello, cuando se produce una alteración en su producción se favorece el desarrollo de lesiones arterioscleróticas.

1.3.2.2. Inicio de la arteriosclerosis. Adhesión leucocitaria

La arteriosclerosis se caracteriza por la acumulación de monocitos y linfocitos-T en la pared arterial. La activación del endotelio conlleva la expresión/secreción de citoquinas, como la interleuquina 1 (IL-1), el fibroblástico básico (bFGF), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos [MCP-1]), así como la exposición de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes^{76,77}. Los grupos de moléculas más importantes de CAM implicados en este proceso son las selectinas, que median en la adhesión transitoria de los leucocitos con el endotelio (destacando la P-selectina, ya que está sobreexpresada en placas de ateroma humanas⁷⁸), y la superfamilia de las inmunoglobulinas, que median en una unión más sostenida. Dentro de las inmunoglobulinas destaca la VCAM-1 (molécula de adhesión vascular -1), una molécula de adhesión endotelial-leucocitaria que parece ser una de las principales moléculas para la adhesión temprana de leucocitos al endotelio arterial en lugares de iniciación de la placa de ateroma⁷⁹.

El proceso de adhesión comienza con el deslizamiento de los leucocitos por la superficie endotelial, la posterior adhesión y, finalmente, la trans migración. La fase de rodamiento y adhesión es el resultado de una interacción específica entre los leucocitos y las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio. Por lo tanto, el evento desencadenante de la expresión de receptores linfocitarios en las CE es la acumulación de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDL_{ox}).

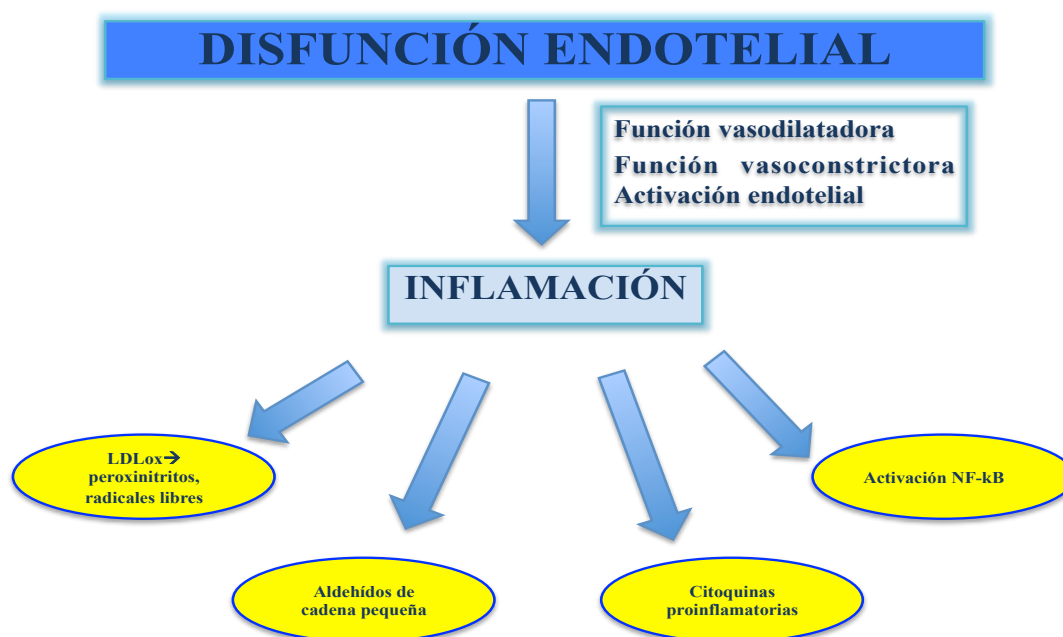


Figura 1.7. Esquema de los procesos iniciadores de la aterogénesis.

1.3.2.3. Migración de los leucocitos

Como se ha mencionado con anterioridad, la actividad inflamatoria desencadenada por la acumulación de LDL_{ox} estimula en las CE la producción de distintas moléculas proinflamatorias, como la ICAM-1, VCAM-1, P-selectina o E-selectina. El rodamiento representa la interacción entre los leucocitos y las selectinas, con la consiguiente adhesión, en la que toman parte las inmunoglobulinas (ICAM y VCAM). La sobreexpresión de las CAM, junto con la inducción de sustancias quimioatrayentes como la MCP-1, facilita la unión y la migración de los monocitos al espacio subendotelial⁸⁰. La consecuencia final es una acumulación de monocitos en la pared vascular secundaria a la situación proinflamatoria.

1.3.2.4. Transformación de los leucocitos y acumulación de lípidos

En los últimos años, el estudio del papel que desempeña la inflamación en la arterioesclerosis se ha centrado en el sistema inmune. La inmunidad innata representa el primer paso en la respuesta inflamatoria, y se fundamenta en la actividad de macrófagos y células dendríticas⁸¹. Una vez los monocitos reclutados pasan al espacio subendotelial de la pared arterial adquieren las características morfológicas de los macrófagos, sufriendo una serie de cambios que les llevan a transformarse en *células espumosas*, que son macrófagos cargados de lípidos, característicos de las lesiones arterioscleróticas.

En el desarrollo de la arteriosclerosis, los receptores más importantes para la inmunidad innata son los llamados receptores *scavenger* y los *toll-like receptors* (TLR)⁸². En un primer tiempo, los receptores *scavenger* SR-A y CD-36 son los responsables del reclutamiento de las LDLox y la transformación de los macrófagos en células espumosas^{83,84}. El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es una glicoproteína expresada por distintos tipos celulares como monocitos y macrófagos, CE, fibroblastos y linfocitos^{85,86} y constituye una de las principales moléculas en la transformación de los monocitos. Rosenfeld et al⁸⁷ demostraron la presencia de M-CSF en lesiones ateroscleróticas en humanos y conejos. El M-CSF aumenta la expresión de receptores *scavenger* SR-A, citoquinas y factores de crecimiento, promoviendo la diferenciación y proliferación de las células espumosas⁸⁸. Junto con el incremento de SR-A se produce un aumento en la expresión de CD36, lo que favorece la internalización por los monocitos de las lipoproteínas modificadas. A su vez, estos macrófagos modificados producen citoquinas que activan a las CML circundantes, resultando en formación de colágeno y fibrosis⁸⁹ (Fig. 1.8).

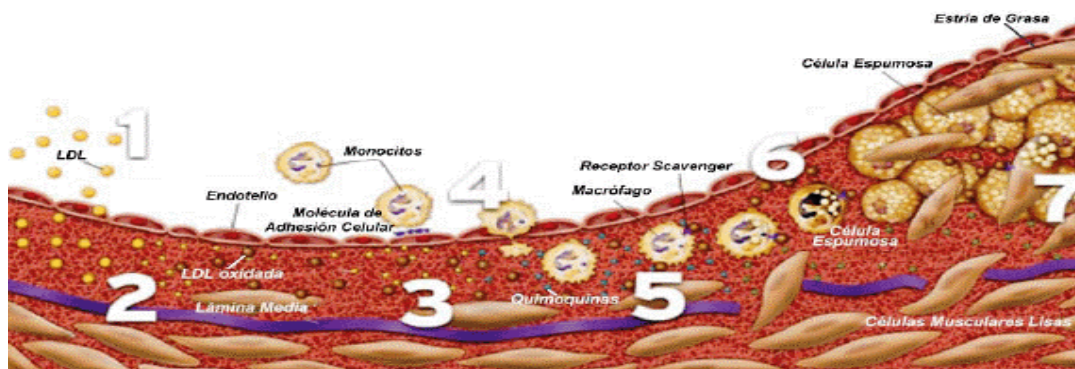


Figura 1.8. Etapas de la formación de la placa arteriosclerótica. 1 y 2, entrada de las lipoproteínas en el espacio subendotelial y oxidación. 3, 4 y 5, liberación de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la diapédesis de monocitos y su diferenciación en macrófagos. 6, formación de células espumosas por la internalización de lipoproteínas modificadas y oxidadas. 7, establecimiento de la estría grasa por la acumulación de células espumosas. Modificado de *Faxon et al*⁹⁰).

La inmunidad adaptativa es mucho más específica que la innata, pero puede tardar de días a semanas hasta estar completamente desarrollada. Se basa en la generación de receptores de linfocitos T y B e inmunoglobulinas que reconocen antígenos en la placa de ateroma. La inmunidad adaptativa constituye la base de grandes avances en el futuro cercano, como la inmunización y el desarrollo de fármacos inmunosupresores.

1.3.2.5. Progresión de la placa de ateroma

La estría grasa es la lesión arteriosclerótica más temprana y asintomática, y solo las CE, los macrófagos y algunas células T participan en su desarrollo. En el progreso de la enfermedad, la respuesta inmunoinflamatoria se asocia a una respuesta inmunoproliferativa mediada por las CML, que son las encargadas de la reparación del daño arterial. Estas CML y la matriz extracelular de colágeno que producen, confieren estabilidad a las placas, protegiéndolas contra complicaciones como la rotura y

trombosis⁹¹. Sin embargo, si el estímulo se mantiene durante el curso de años, como ocurre habitualmente, la respuesta *reparadora* puede hacerse muy voluminosa, ir invadiendo el lumen de la arteria y, finalmente, producir un cuadro de isquemia del territorio afectado⁹².

Cuando se produce la descamación de CE las plaquetas se adhieren a la lesión, activándose y degranulando sustancias fibrogénicas, como el PDGF, promoviendo la proliferación de CML y la acumulación de matriz extracelular^{93,94}. El PDGF aumenta la síntesis de colágeno y con ello se favorece un aumento de la capa fibrosa de la placa de ateroma. Los leucocitos infiltrados en la lesión y las CE también pueden producir PDGF.

Durante la progresión de la arteriosclerosis, las CE, los macrófagos y las CML van muriendo por apoptosis o necrosis. La apoptosis contribuye a la acción del factor tisular (TF) y a la trombogenicidad del *core* lipídico de la placa⁹⁵.

La calcificación focal en las placas de arteriosclerosis es muy común y se incrementa con la edad⁹⁶. En los procesos de mineralización están implicadas las CML vasculares, debido a su capacidad para producir osteopontina, una proteína involucrada en la formación de hueso y la mineralización^{97,98}.

1.3.2.6. Rotura de la placa de ateroma

Existen dos mecanismos que determinan la rotura de la placa, bien sea de forma independiente o en conjunción. El primero está relacionado con fuerzas físicas y se produce, sobre todo, cuando la capa fibrosa es más fina y está más intensamente infiltrada por células espumosas. El segundo mecanismo se relaciona con la actividad intraplaca de los macrófagos⁹⁹ y mastocitos¹⁰⁰, que degradan la matriz extracelular por fagocitosis o liberación de enzimas proteolíticas (por ejemplo, metaloproteasas). Por

tanto, se ha considerado que, más que el grado de estenosis, la composición y el estado de la placa son los principales responsables de la enfermedad aterotrombótica^{101,102,103}.

Por lo tanto, como se observa en la Figura 1.9, podríamos definir diferentes tipos de placas ateromatosas: las “vulnerables”, con una capa fibrosa fina, alto acúmulo lipídico y un gran número de células inflamatorias, y que pueden evolucionar a la ruptura de la misma; y placas “estabilizadas”, en la que la inflamación y el acúmulo lipídico son menores, mientras que la capa fibrosa es mayor, siendo su riesgo de ruptura menor que en el caso de las anteriores.

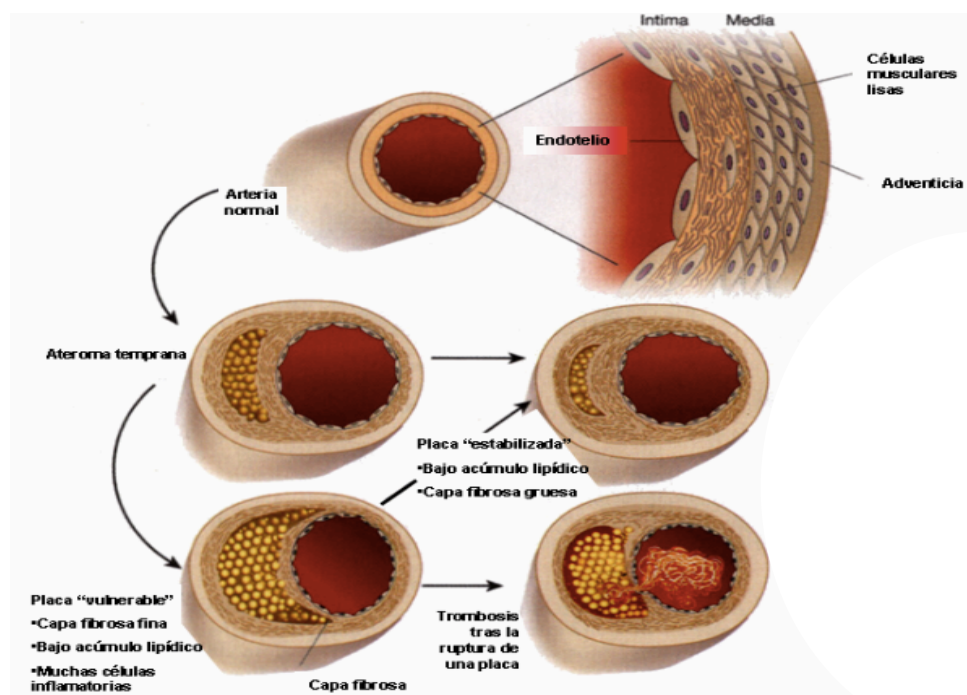


Figura 1.9. Esquema del proceso de formación y desarrollo de la placa de ateroma, desde las primeras etapas, la posibilidad de estabilización o desestabilización y, en este último caso, la trombosis. Adaptado de Libby et al.⁷⁹

En la rotura de la placa de ateroma también están asociados fenómenos de apoptosis que afectan a todas las líneas celulares, pero con un gran predominio a los macrófagos¹⁰⁴. Estas células apoptóticas favorecen el reclutamiento de otras células inflamatorias y, por tanto, también contribuyen a todo el proceso inflamatorio. Mallat et

al¹⁰⁵ demostraron la íntima asociación entre apoptosis e inflamación, coexistiendo ambos procesos en áreas de rotura de la placa.

Cuando se produce dicha rotura, queda expuesto el *core* lipídico, altamente trombogénico por su contenido en TF, que es un elemento clave en la iniciación de la cascada de la coagulación, siendo esencial en la trombosis que sigue a la disrupción de la placa. La actividad es muy dependiente de la presencia de la fosfatidilserina, un fosfolípido aniónico que se redistribuye en la superficie de la membrana celular durante la muerte por apoptosis, confiriendo un potencial trombogénico a la célula apoptótica (principalmente los macrófagos).

Además, moléculas de CD40-L unido a las plaquetas son capaces de incrementar aún más el estado proinflamatorio y protrombótico. Incluso en ausencia de fisuras en la placa, las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) pueden potenciar las propiedades procoagulantes de las CE y de los neutrófilos y contribuir así a las complicaciones trombóticas de la placa de ateroma¹⁰⁶.

1.4. DIABETES MELLITUS Y ARTERIOESCLEROSIS

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas en la que el páncreas no es capaz de producir insulina (diabetes mellitus tipo 1- DM1-), la producción de insulina no es suficiente o las células no pueden utilizar esta hormona de forma eficaz (diabetes mellitus tipo 2- DM2-)¹⁰⁷. Como la insulina es necesaria para la captación celular de glucosa para su posterior conversión en energía, en la diabetes existe una elevación de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), siendo éste el factor determinante del desarrollo de las complicaciones derivadas de la DM, que afectan al sistema cardiovascular y nervioso, ojos o riñones.

Con alrededor de 350 millones de casos en 2014¹⁰⁸, la diabetes mellitus tipo 2

(DM2) es una de las enfermedades más frecuentes en todo el mundo. Cada año, 4,9 millones de personas mueren a causa de la diabetes¹⁰⁸, el 50% de ellos por complicaciones cardiovasculares¹⁰⁹. En particular, la diabetes mellitus se asocia con complicaciones micro y macrovasculares, que producen aumento de la prevalencia de enfermedad coronaria y enfermedad arterial periférica, con el consiguiente aumento de la morbilidad y la mortalidad¹¹⁰.

1.4.1. Mecanismo de lesión vascular inducida por la hiperglucemia.

Se ha propuesto al estrés oxidativo como el mecanismo patogénico fundamental que relaciona la resistencia a la insulina con la disfunción de las células β y las alteraciones dependientes del endotelio que finalmente conducen a la diabetes manifiesta y la enfermedad cardiovascular^{111,112,113,114}, por un aumento de un estado protrombótico y proinflamatorio¹¹⁵.

Las altas concentraciones de glucosa intracelular conducen a la activación de la proteína C quinasa (PKC) y la subsiguiente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la NADPH oxidasa¹¹⁶, por la proteína adaptadora p66shc (implicada en la generación de ROS en la mitocondria y en la traducción de la señal oxidativa a apoptosis)^{117,118}.

El aumento del estrés oxidativo inactiva rápidamente al óxido nítrico (NO) y conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO-), un potente oxidante responsable de nitrosilación de proteínas. Esta reducción de la disponibilidad de NO se debe también a la desregulación de la NO sintasa endotelial (eNOS) dependiente de PKC (la PKC favorece el desacoplamiento de eNOS)^{119,120,121} y a que la hiperglucemia por sí sola reduce la actividad de eNOS de forma independiente.

Junto con la falta de NO, la activación de PKC inducida por la hiperglucemia provocan un aumento de la síntesis de endotelina 1 (ET-1)¹²² que favorece la vasoconstricción y agregación plaquetaria.

La acumulación del anión superóxido también aumenta la expresión de los genes de las proteínas proinflamatorias molécula quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) a través de la activación de la señalización de NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, que es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN)¹²³. Estos eventos conducen a una adhesión y modificación de monocitos, con la consiguiente formación de células espumosas en el endotelio. Las citoquinas inflamatorias derivadas de las células espumosas mantienen la inflamación vascular así como la proliferación de células musculares lisas, acelerando el proceso aterosclerótico¹²⁴.

La disfunción endotelial en la diabetes también se deriva del aumento de la síntesis de TXA2 través de la regulación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la inactivación de la prostaglandina I sintetasa (PGIS) por el aumento de nitrosilación¹²⁵.

Además, ROS aumenta la síntesis del metabolito de glucosa metilglioxal, que conduce al aumento de productos finales de glicación avanzada (AGE)^{126,127} y a la consiguiente activación de las vías de la hexosamina y del poliol. La primera conduce a diferentes patrones de glicosilación que son responsables de la desregulación de enzimas implicadas en la homeostasis vascular, como la eNOS mencionada previamente¹²⁸, o la glicosilación de factores de transcripción que causan un aumento de la expresión de genes de proteínas inflamatorias (como TGF alfa y beta 1) y protrombóticas (inhibidor del activador del plasminógeno- I)^{128,129}. La vía de los

polioles está directamente implicada en el estrés oxidativo¹³⁰, y su hiperactivación se ha relacionado con el aumento de lesiones ateroscleróticas en ratones diabéticos¹³¹.

1.4.2. La coagulación y la reactividad de las plaquetas en la diabetes.

En pacientes con diabetes, la hiperglucemia crónica y la resistencia a la insulina determinan una alteración significativa en los factores de coagulación, así como un aumento de la agregación plaquetaria, lo que lleva a un estado protrombótico^{132,133} ya que, en condiciones fisiológicas, la insulina inhibe al factor tisular y aumenta la acción fibrinolítica a través de la modulación de los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)¹³⁴.

Además, es importante mencionar que se ha observado un aumento de la actividad biológica de FXa¹³⁵ así como una mayor generación de FXa en las plaquetas de los pacientes diabéticos, que puede contribuir a aumentar la exposición de la pared vascular diabética a FXa¹³⁶.

- **Plaquetas**

El aumento de la agregación plaquetaria en DM es debido al aumento de la producción sistémica de isoprostanos (incluyendo TxA2), el aumento de la capacidad de respuesta a los factores activadores de plaquetas (PAF) como la epinefrina y ADP, y al deterioro de la producción de PGI2 y NO. DM también causa un aumento de la expresión de la glicoproteínas en la superficie plaquetaria, lo que aumenta la agregación plaquetaria y la interacción de plaquetas con la fibrina. La hiperglucemia también activa PKC y genera ROS en las plaquetas que causando aún más disfunción, como se detalló previamente.

Mientras que muchos de estos cambios fisiopatológicos probablemente son el resultado de las consecuencias metabólicas de la resistencia a la insulina, el aumento de la reactividad plaquetaria también se ha encontrado en pacientes con DM tipo I sin resistencia a la insulina. Por lo tanto, la hiperglucemia por sí sola representa al menos parte de la respuesta plaquetaria alterada debido a los efectos relacionados con AGE en los receptores de superficie de las plaquetas^{110,137,138}.

- **Hipercoagulabilidad**

Independientemente de la disfunción plaquetaria, la diabetes induce un estado de hipercoagulabilidad. Existen niveles elevados de PAI-1 (que disminuyen la actividad fibrinolítica), de factor tisular en monocitos^{139,140} y en el endotelio de pacientes diabéticos¹⁶⁰, así como de los factores VII y XIII. También hay una disminución relativa en la antitrombina III y la proteína C. El factor de Von Willebrand¹⁴¹ y el factor VIII también se encuentran aumentados, posiblemente debido a la lesión tisular^{110,122}.

1.4.3. Obesidad y diabetes: resistencia a la insulina como causa de aterotrombosis.

En los sujetos con obesidad, existe un aumento de la oxidación de ácidos grasos para favorecer su utilización como combustible energético, previniendo un mayor acúmulo de tejido adiposo¹⁴². Este aumento de ácidos grasos libres activa el receptor tipo toll (del inglés, toll-like receptor, TLR) que conduce al aumento de expresión de genes inflamatorios de interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), vía NF- κ B¹⁴³. Por otro lado, la activación de TLR conduce a la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina 1(IRS-1) por la c-jun aminoterminal kinasa (JNK) y la proteína kinasa C, dando como resultado una alteración en el transportador de glucosa GLUT-4 y, por lo tanto, la resistencia a la insulina¹⁴⁴. La disminución de la sensibilidad

a la insulina del endotelio vascular conduce a un aumento de la oxidación de ácidos grasos libres, la formación de ROS, y la posterior activación de las vías bioquímicas perjudiciales que se explicaron previamente (activación de la PKC, síntesis de AGE, glicosilación de proteínas, inhibición de eNOS, etc.), lo que conduce a la disfunción endotelial^{143,145}.

1.4.4. Micro-ARN y enfermedad vascular en pacientes diabéticos

Los microARN (miRs) son pequeños fragmentos de RNAs no codificantes identificados recientemente como moléculas clave en la patogénesis del daño vascular inducido por la diabetes^{146,147}. Estos pequeños RNAs no codificantes orquestan diferentes aspectos de la enfermedad vascular diabética mediante la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Estudios con microarrays han demostrado un perfil alterado de expresión de miRs en sujetos con diabetes tipo 2^{148,149,150}. De hecho, los pacientes diabéticos muestran una desregulación significativa de miRs implicados en la angiogénesis, reparación vascular, y homeostasis endotelial¹⁴⁸. En los últimos años, diferentes estudios han explorado los mecanismos por los que la desregulación de la expresión de miRs puede contribuir a la enfermedad vascular en pacientes con diabetes. En las células endoteliales expuestas a la hiperglucemia miR-320 se expresa de forma aumentada y tiene como blanco varios factores angiogénicos y sus receptores, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1). Los niveles elevados de este miR se asocian con una disminución de la proliferación y migración celular, mientras que su regulación a la baja restaura estas propiedades y aumenta la expresión de IGF-1, la promoción de la angiogénesis y la reparación vascular¹⁵¹. La hiperglucemia también aumenta la

expresión de miR-221, un regulador de la angiogénesis focalizado en el receptor c-kit, que es el responsable de la migración de las células progenitoras endoteliales (EPC)¹⁵².

También se ha demostrado la mediación de miR-221 y 222 en el daño vascular producido por AGEs¹⁵³. De hecho, la regulación a la baja de miR-222, tanto en células endoteliales humanas expuestas a hiperglucemia como en ratones diabéticos provoca una disfunción endotelial mediada por AGEs a través de las proteínas quinasa dependientes de ciclina involucradas en la inhibición del ciclo celular (P27KIP1 y p57KIP2)¹⁵³. Un estudio reciente demostró que el miR-503 está directamente involucrado en la disfunción endotelial inducida por la hiperglucemia en ratones diabéticos y se encuentra elevado en músculos de extremidades isquémicas de pacientes diabéticos¹⁵⁴. Los efectos perjudiciales de miR-503 en el control de la diabetes han sido explicados por su interacción con CCNE y cdc25A, dos reguladores principales del ciclo celular que afectan a la migración y la proliferación de las células endoteliales.

Curiosamente, la inhibición de miR-503 fue capaz de normalizar la neovascularización postisquémica y restablecer el flujo sanguíneo en ratones diabéticos. Estos resultados muestran que la modulación de la expresión de miR-503 podría evitar las complicaciones vasculares de la diabetes.

Se ha observado una gran disminución de miR-126 en una cohorte de pacientes diabéticos¹⁴⁸. La evidencia reciente sugiere que la reducción de la expresión de miR-126 es parcialmente responsables del deterioro de la capacidad de reparación vascular en la diabetes^{155,156}.

En conjunto, estos estudios apoyan la idea de que miRs dirigen una compleja red de señalización mediante la modificación de la expresión de genes implicados en la diferenciación, la migración y la supervivencia celular¹¹⁵.

1.5. HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN

1.5.1. Hemostasia

La hemostasia, definida como la detención de la hemorragia, viene del griego hemo, que significa sangre, y estasis, que significa detención¹⁵⁷. La coagulación es el proceso por el que se forma un coágulo para producir hemostasia y su concepto tal cual lo conocemos hoy se remonta a 1960 cuando Davie, Ratnoff y Macfarlane describieron la teoría de "cascada" como el principio fundamental de la coagulación¹⁵⁸. Este equilibrio trombohemorrágico se mantiene por complicadas interacciones entre la coagulación y el sistema fibrinolítico, así como por las plaquetas y la pared del vaso. Por lo general, el proceso de coagulación está bajo el control de varios inhibidores que limitan la formación del coágulo, evitando así la propagación del trombo. Este delicado equilibrio se interrumpe cada vez que se incrementa la actividad procoagulante de los factores de coagulación, o la actividad de los inhibidores de origen natural se reduce¹⁵⁹.

La hemostasia se lleva a cabo en 3 fases: vasoconstricción refleja, hemostasia primaria (agregado plaquetario) y hemostasia secundaria (coagulación).

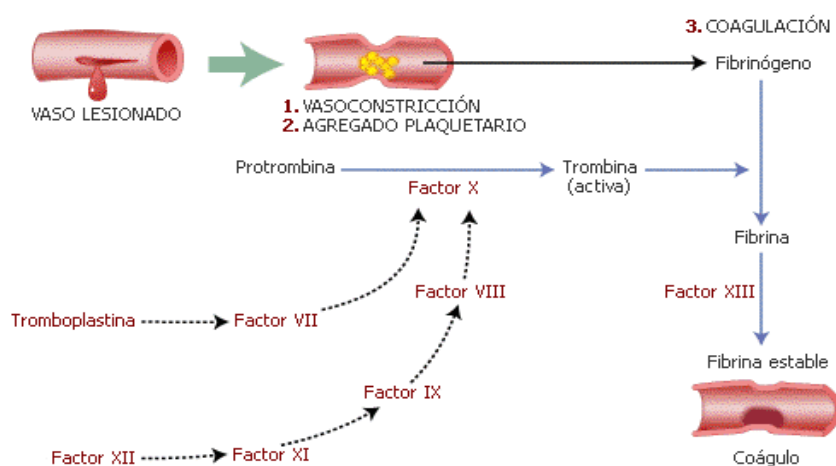


Figura 1.10. Esquema de la hemostasia.

1.5.1.1.- Vasoconstricción refleja

Es una respuesta transitoria inmediata a un daño del vaso sanguíneo, desencadenando un espasmo vascular que disminuye el diámetro del vaso y retrasa la hemorragia. Está mediada por mecanismos reflejos neurogénicos por acción del sistema nervioso simpático y la liberación de mediadores locales como la endotelina y el tromboxano A₂ derivado de plaquetas (TXA₂)^{160,161}. Asimismo la vasoconstricción favorece la marginación de las células sanguíneas, acercándolas al sitio de la lesión, de manera que se facilitan las interacciones entre las plaquetas y el subendotelio.

1.5.1.2.- Hemostasia primaria

Es el proceso de formación del "tapón hemostático primario" o "tapón plaquetario", iniciado segundos después del traumatismo vascular. Resulta de interacciones complejas entre las plaquetas, la pared del vaso y proteínas adhesivas. Normalmente las plaquetas no se adhieren al endotelio vascular intacto. Después de la lesión vascular, éstas se adhieren al colágeno y al vWF en el tejido subendotelial y sufren un cambio morfológico adquiriendo una superficie irregular al formar numerosos pseudópodos que aumentan drásticamente su superficie y forman el tapón de plaquetas, que sella la lesión vascular temporalmente¹⁶².

1.5.1.3.- Hemostasia secundaria

Comúnmente llamada coagulación. La coagulación es un proceso enzimático complejo, por el cual el fibrinógeno soluble se convierte en fibrina insoluble, capaz de polimerizar y entrecruzarse, formando el coágulo secundario, estable e insoluble. La cascada de la coagulación tradicionalmente ha sido clasificada en vías intrínseca y extrínseca, convergiendo ambas en la activación del factor X, el activador de la

protrombina, que transforma la protrombina en trombina e inicia todos los pasos posteriores de la coagulación.

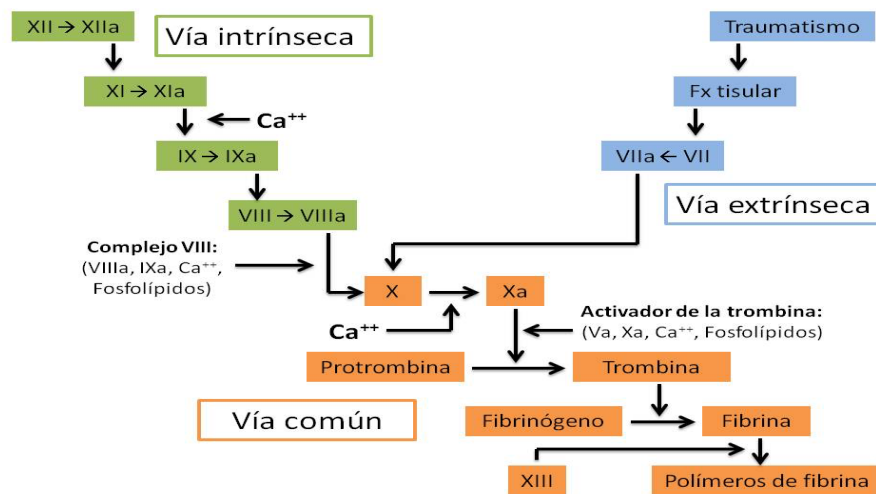


Figura 1.11. La cascada de coagulación.

- **Vía extrínseca**

Comienza con el traumatismo de la pared vascular y de los tejidos adyacentes, y podría esquematizarse de la siguiente manera^{163,164}:

1. Liberación del factor tisular.
2. Activación del factor X: el complejo lipoproteico del factor tisular se une en un complejo con el factor VII de la coagulación, y en presencia de los iones de calcio actúa enzimáticamente sobre el factor X para dar el factor X activado (Xa)¹⁶⁵.
3. Efecto del factor Xa para formar el activador de la protrombina. El factor Xa se combina de inmediato con los fosfolípidos tisulares que integran el factor tisular, o con los fosfolípidos adicionales liberados por las plaquetas, así como el factor V para dar el complejo activador de la protrombina. A los pocos segundos y en presencia de los iones calcio, éste escinde la protrombina para formar trombina y el proceso de coagulación prosigue como antes. Al principio, el factor V del complejo activador de la

protrombina está inactivo, pero una vez que comienza la coagulación y se empieza a producir trombina, la acción proteolítica de ésta activa el factor V. Éste acelera entonces mucho la activación de la protrombina. Así pues, dentro del complejo final activador de la protrombina, el factor Xa es la proteasa verdadera que escinde la protrombina en trombina, el factor Va acelera enormemente esta actividad proteasa, y los fosfolípidos plaquetarios actúan como un vehículo que acelera aún más el proceso.

- **Vía intrínseca**

Se inicia en la propia sangre y es el segundo mecanismo para iniciar la formación del activador de la protrombina.

1. Comienza con el traumatismo de la propia sangre o con la exposición de la sangre al colágeno procedente de la pared de un vaso sanguíneo lesionado, que activa el factor VII y libera fosfolípidos plaquetarios. Cuando se altera el factor VII adquiere una nueva configuración molecular que lo convierte en una enzima proteolítica llamada factor VII activado (VIIa). Al mismo tiempo el traumatismo sanguíneo lesiona las plaquetas como consecuencia de su adhesión al colágeno; de esta forma se liberan fosfolípidos plaquetarios que contienen la lipoproteína llamada factor plaquetario III, que también interviene en las reacciones de coagulación posteriores.

2. Activación del factor VI. El factor VII activado actúa enzimáticamente sobre el factor V para activarlo, lo que constituye el segundo paso de la vía intrínseca. Esta reacción también precisa cininógeno HMW y se acelera por la precalicreína.

3. Activación del factor IX por el factor XI activado. El factor XIa actúa entonces sobre el factor IX de forma enzimática para activarlo.

4. Activación del factor X. El factor IXa, junto al factor VIIIa y con los fosfolípidos plaquetarios y el factor III de las plaquetas lesionadas activa el factor X. Es

evidente que cuando disminuye el aporte de factor VIII o de plaquetas, este paso resulta deficiente¹⁶⁶.

5. Acción del factor Xa para formar el activador de la protrombina. Este paso de la vía intrínseca coincide con el último de la vía extrínseca. Es decir, el factor Xa se combina con el factor V y los fosfolípidos plaquetarios o tisulares para formar el complejo llamado activador de la protrombina. El activador de la protrombina inicia a su vez, en cuestión de segundos, la escisión de la protrombina para formar trombina, poniendo en marcha el proceso final de la coagulación¹⁶⁷.

- **Conversión de la protrombina en trombina.**

Después de formarse el activador de la protrombina, en presencia de cantidades suficientes de calcio iónico, provoca la conversión de protrombina en trombina. La trombina produce, a su vez, la polimerización de las moléculas de fibrinógeno en fibras de fibrina en otros 10 a 15 segundos. Así pues, el factor limitador de la coagulación sanguínea suele residir en la formación del activador de la protrombina y no en las reacciones posteriores, porque estas etapas finales se desarrollan normalmente con rapidez para formar el propio coágulo.

Las plaquetas también desempeñan un papel importante en la conversión de la protrombina en trombina, porque gran parte de la protrombina se une primero a los receptores de la protrombina en las plaquetas que ya se han adherido al tejido dañado. A continuación, esta unión acelera la formación de más cantidad de trombina a partir de la protrombina, esta vez en el tejido específico donde se necesita el coágulo.

- **Conversión del fibrinógeno en fibrina: formación del coágulo.**

La trombina actúa como enzima y convierte el fibrinógeno en fibras de fibrina; elimina cuatro péptidos de bajo peso molecular de cada molécula de fibrinógeno creando una molécula de monómero de fibrina con capacidad automática para polimerizar con otras moléculas de monómero de fibrina, que atrapan en su red plaquetas, células sanguíneas y plasma para formar el coágulo¹⁶⁸.

1.5.2. Factor X y efectos pleiotrópicos del factor Xa

El factor X de la coagulación también conocido como el factor Stuart Prower o autotrombina III es una proteasa de la serina (enzima) que depende de la vitamina K. Es un factor relativamente estable en suero a 37°C en un pH de 6 a 9, sin embargo se inactiva rápidamente fuera de estos valores. El gen que codifica para este factor se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13 en proximidad al gen del factor VII. Este gen se expresa de manera principal en el hígado, por tanto se produce especialmente por las células hepáticas.

Con respecto a los efectos del FXa más allá de su papel en la coagulación, varios estudios documentaron hace ya casi 2 décadas efectos directos sobre la pared vascular administrando de forma sistémica FXa y objetivando una respuesta hipotensiva en ratas anestesiadas por liberación de óxido nítrico¹⁶⁹, o un aumento de esta liberación en anillos aislados de aorta de rata in vitro¹⁷⁰.

Actualmente se postula que la activación del factor X durante la hemostasia, como consecuencia de daños tisulares o inflamación, parece jugar un papel clave en el proceso de remodelación de los tejidos y la fibrosis, principalmente debido a las propiedades mitogénicas y su capacidad para inducir la expresión de quimiocinas y citoquinas^{171,172,173}.

Los efectos mitogénicos mediados por el factor Xa se han documentado en las células del músculo liso de las arterias coronarias, siendo mediadas por el receptor activado por proteasa (PAR1), residente en los fibroblastos del corazón y pulmón^{174,175}; mientras que la mediación por PAR2 ha demostrado estar involucrada en la fibrosis pulmonar y renal^{176,172}. Además, el factor Xa actúa como un potente inductor in vitro de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [interleucina (IL) -6, IL-8, y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) - 1] por los fibroblastos, linfocitos y células endoteliales, además de moléculas de adhesión en los monocitos^{177,178,179}.

1.6. RIVAROXABÁN

1.6.1. Descripción del fármaco, mecanismo de acción y ficha técnica.

Grupo farmacoterapéutico: inhibidores directos del factor Xa, código ATC: B01AF01/

Bay 59-7939.

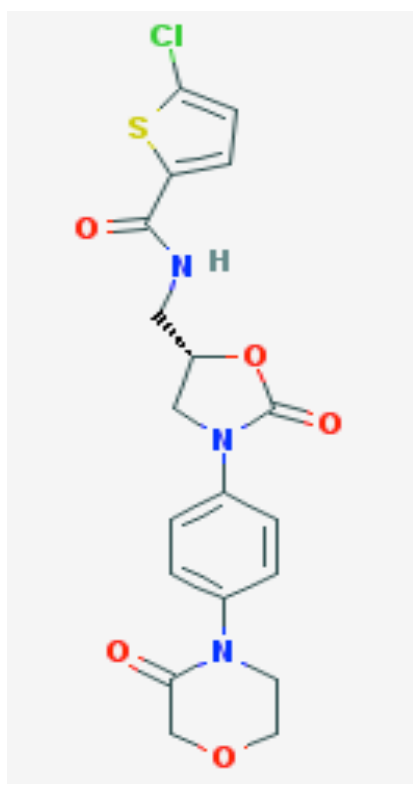


Figura 1.12. Molécula de rivaroxabán.

Nombre químico	5-cloro-N-({(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinilo)fenil]-1,3-oxazolidin-5-yl} metil)-2-tiofenocarboxamida
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S
Peso molecular	435,88132 g / mol
Nombre comercial	Xarelto
Titular de la autorización de comercialización	Bayer Pharma AG D-13342 Berlin Alemania
Número de autorización de comercialización	EU/1/08/472/025-035
Patente	7592339; 7585860; 7157456

Tabla 1.1. Ficha técnica.

- **Mecanismo de acción.**

Rivaroxabán es un anticoagulante, inhibidor directo del factor X activado (Xa). El factor Xa desempeña un papel central en la cascada de coagulación de la sangre, al servir como el punto de convergencia de las vías intrínseca y extrínseca; la inhibición del factor de coagulación Xa por rivaroxabán evita la formación de trombos al impedir la conversión de protrombina a trombina.

Rivaroxabán inhibe el factor Xa de una manera dependiente de la concentración (constante de inhibición $[K_i]$, 0,4 nmol / L), y es un inhibidor competitivo del factor Xa¹⁸⁰. Tiene un rápido inicio de acción (constante de velocidad de asociación cinética $[k_{on}]$, $1,7 \times 10^7$ mol / l-1 s-1) y es reversible (constante de velocidad de disociación cinética $[K_{off}]$, 5×10^{-3} s-1)¹⁸¹ y, a diferencia de fondaparinux, heparina sódica y las heparinas de bajo peso molecular, rivaroxabán se une directamente al sitio activo del factor Xa sin la necesidad de un cofactor (por ejemplo, antitrombina III)¹⁸².

Rivaroxabán inhibe el factor Xa con más de 100.000 veces mayor selectividad que otras proteasas de serina biológicamente importantes (por ejemplo, la trombina, tripsina, plasmina, el factor VIIa, el factor IXa, uroquinasa, la proteína C activada)^{180,183}.

No inhibe la trombina (factor II activado) y no se han demostrado efectos sobre las plaquetas.

1.6.2. Indicaciones terapéuticas.

Las indicaciones aprobadas por la FDA y la Agencia Europea de Medicina son^{183,184}.

- Prevención del tromboembolismo venoso (TEV) de los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica de prótesis de cadera o rodilla.

- Prevención de ictus de etiología embólica y embolismo sistémico en pacientes con fibrilación auricular no valvular.
- Tratamiento de trombosis venosas profundas (TVP) o embolismos pulmonares y prevención de TEV recurrentes.
- Prevención de episodios aterotrombóticos tras padecer un síndrome coronario agudo. Se utiliza en combinación con antiagregantes plaquetarios.

Estas indicaciones se fundamentan en importantes ensayos clínicos como los tres que componen el programa EINSTEIN¹⁸⁵ en el caso del tratamiento y prevención del TEV, que mostrarían resultados equivalentes con respecto a los anticoagulantes utilizados clásicamente, y que se llevaron a cabo en mas de 3000 pacientes cada uno. El ROCKET AF¹⁸⁶, en el que fue comparable el rivaroxabán con la warfarina en la prevención de ictus de etiología embólica y embolismo sistémico en pacientes con fibrilación auricular no valvular. Y, por último, los ensayos clínicos ATLAS¹⁸⁷, en el que rivaroxabán mostró una menor incidencia de muerte de causa cardiovascular, infarto agudo de miocardio e ictus frente a placebo en pacientes con cardiopatía isquémica.

1.6.3. Farmacodinámica y farmacocinética^{183,184,188}

1.6.3.1. Farmacodinámica.

Rivaroxabán es un anticoagulante que se une directamente al factor Xa y bloquea eficazmente la cascada de la coagulación, por lo tanto evita la formación de trombos. Es un anticoagulante único por dos razones: en primer lugar, no requiere de la intervención de la antitrombina III (ATIII) para ejercer sus efectos anticoagulantes; en segundo lugar, es un agente oral mientras que la heparina no fraccionada y las heparinas de bajo peso molecular son sólo para uso parenteral¹⁸⁹. Aunque el tiempo de

tromboplastina parcial activada (TTPa) y HepTest (una prueba desarrollada para analizar la cantidad de heparinas de bajo peso molecular en sangre) se prolonga de una manera dependiente de la dosis, no se recomienda ninguna prueba para la evaluación de los efectos farmacodinámicos de rivaroxabán. La actividad anti-Xa y la monitorización de la actividad inhibitoria de anti-Xa tampoco se recomiendan a pesar de estar influenciados por rivaroxabán.

1.6.3.2. Farmacocinética: absorción, distribución y biotransformación y eliminación.

- **Absorción.**

Rivaroxabán se absorbe rápidamente y alcanza concentraciones máximas (C_{max}) de 2 a 4 horas después de tomar el comprimido^{190,191}.

La absorción oral de rivaroxabán es casi completa y su biodisponibilidad oral es elevada (80% al 100%) en el caso de la dosis del comprimido de 2,5 mg y de 10 mg, independientemente de las condiciones de ayuno o alimentación¹⁸³.

La absorción de rivaroxabán es dependiente del sitio de liberación del fármaco en el tracto gastrointestinal. Se ha notificado una disminución del 29% y 56% en el AUC y la C_{max} en comparación con el comprimido, cuando rivaroxabán en forma de granulado se liberó en el intestino delgado proximal. La exposición se reduce aún más cuando rivaroxabán se libera en el intestino delgado distal o en el colon ascendente. Por lo tanto, debe evitarse la administración de rivaroxabán de forma distal al estómago, ya que esto puede dar lugar a una reducción de la absorción y la correspondiente exposición a rivaroxabán¹⁸⁸.

La variabilidad de la farmacocinética de rivaroxabán es moderada; con una variabilidad interindividual (CV %) entre el 30 y el 40%.

- **Distribución.**

La unión a proteínas plasmáticas de rivaroxabán en el plasma humano es de aproximadamente 92% a 95%, siendo la albúmina la principal proteína de unión. El volumen de distribución es moderado, en sujetos sanos es de aproximadamente 50 L¹⁸⁸.

- **Biotransformación y eliminación.**

Tras la administración oral, aproximadamente un tercio de la dosis absorbida se excreta sin cambios en la orina¹⁹², y los dos tercios restantes se excretan en forma de metabolitos inactivos, tanto en la orina y como en las heces. Tras la administración de una dosis C₁₄-rivaroxabán, 66% de la dosis radiactiva se recupera en la orina (36% como fármaco inalterado) y 28% en las heces (7% como fármaco inalterado) . El fármaco inalterado se excreta en la orina, principalmente a través de la secreción tubular activa y en menor medida a través de filtración glomerular (aproximada 5: 1 ratio)¹⁸⁸.

Rivaroxabán se metaboliza mediante el CYP3A4, el CYP2J2 y mecanismos independientes del CYP¹⁹³. Las principales vías de biotransformación son la degradación oxidativa de la porción de morfolinona y la hidrólisis de los enlaces amida¹⁸³. Según investigaciones *in vitro*, rivaroxabán es un sustrato de las proteínas transportadoras P-gp (glucoproteína P) y Bcrp (proteína de resistencia al cáncer de mama)¹⁹⁴.

Rivaroxabán en forma inalterada es el compuesto más abundante en el plasma humano sin presencia de metabolitos mayores o metabolitos activos circulantes. Con un aclaramiento sistémico de aproximadamente 10 l/h, rivaroxabán puede clasificarse como una sustancia de bajo aclaramiento. Después de la administración por vía intravenosa de una dosis de 1 mg, la semivida de eliminación es de aproximadamente

4,5 horas. Después de la administración por vía oral, la eliminación se ve limitada por la tasa de absorción.

En personas jóvenes, la eliminación de rivaroxabán del plasma se produce con una semivida de eliminación de 5 a 9 horas y en personas de edad avanzada, con una semivida de eliminación de 11 a 13 horas¹⁸⁸.

1.7. PROTEÓMICA

La proteómica es una técnica que permite el estudio a gran escala de las proteínas de una muestra, constituyendo uno de los más útiles y potentes métodos de separación de proteínas que existe actualmente.

El proteoma de un organismo es el conjunto de proteínas complementarias del genoma funcional y es altamente dinámico, varía acorde al tipo de célula y su estado funcional y puede reflejar cambios inmediatos y característicos en respuesta a determinadas enfermedades o estímulos externos. Este conjunto de proteínas presentes en un fluido corporal, un tejido o un organismo en realidad es un subconjunto de todos los posibles productos del genoma en un momento dado, por lo que el proteoma no puede predecirse directamente a partir de la información estática del genoma. Una proteína puede existir en múltiples formas según modificaciones postraduccionales o procesos de degradación que modifican la estructura de la misma, su localización, función y recambio, por lo que las células humanas pueden producir varias proteínas distintas a partir de un único gen^{195,196}. Por ello, la investigación centrada en estos productos derivados del genoma, modificables en condiciones de enfermedad, es fundamental y probablemente nos permitirá entender la fisiopatología de enfermedades tan prevalentes como la arteriosclerosis: nos encontramos en la *era postgenómica*.

La proteómica utiliza la combinación de diferentes técnicas sofisticadas, incluyendo la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida, análisis de imagen, espectrometría de masas, secuenciación de aminoácidos y bioinformática para separar, identificar y caracterizar las proteínas¹⁹⁷. Con todo ello, la proteómica permite la obtención de una información cualitativa y cuantitativa: es posible determinar la existencia o no de una proteína y, además, cambios cuantitativos en su expresión comparando los resultados en la muestra basal y tras un estímulo o condición patológica, por ejemplo.

1.7.1. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (“2-dimensional electrophoresis”, 2-DE) es una técnica de separación de mezclas complejas de proteínas de gran capacidad resolutive. Consistente en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis realizadas sobre la misma muestra^{198,199}. En primer lugar se realiza un isoelectroenfoco (“isoelectric focusing”, IEF) donde las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoeléctrico (pI, que es el pH en el cual la carga neta de la proteína es cero). A continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS donde las proteínas se separan en función de su masa molecular (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; el SDS es un detergente aniónico utilizado para alinear las proteínas y aplicar una carga negativa a cada proteína proporcional a su masa). La dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones. La técnica fue desarrollada inicialmente en los años 70 por Kenrick & Margolis²⁰⁰, Klose²⁰¹ y O’ Farrell²⁰², pero su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la

invención de un método para generar gradientes de pH inmovilizados (“immobilized pH gradients”, IPG)²⁰³. Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y permitieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles hoy día en Internet²⁰⁴. En los últimos tiempos, el desarrollo de la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos. Se trata de una técnica basada en el marcaje fluorescente de las proteínas previo a su separación, lo que le otorga una gran precisión en la cuantificación, que además permite la separación de varias muestras proteicas en un mismo gel²⁰⁵, incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras.

Una vez realizada la segunda dimensión, las proteínas presentes en el gel deben visualizarse para poder cuantificarlas y analizarlas. Existen distintos tipos de tinción del gel que, fundamentalmente, se diferencian según la sensibilidad para la detección de proteínas. Destacan la tinción con azul *Coomassie*, la tinción radiactiva, la fluorescente y, por último, la tinción con nitrato de plata. Los métodos más empleados son la tinción con plata y con el azul de *Coomassie*²⁰⁶, en especial la primera por su sensibilidad^{207,208}, su durabilidad en el tiempo y la buena calidad de imagen que ofrece. Además, este tipo de tinción es compatible con el análisis por espectrometría de masas.

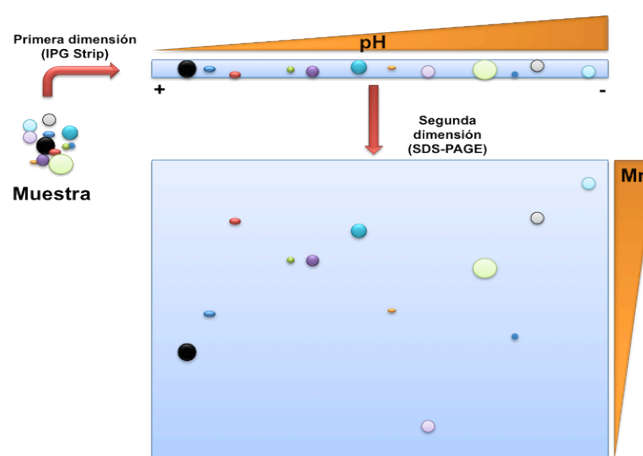


Figura 1.13. Esquema del principio de la electroforesis bidimensional. La muestra es separada en dos dimensiones, primero por punto isoelectrico y segundo por peso molecular. Fuente: [https://proteomeplus.files.wordpress.com/2011/07/esquema-](https://proteomeplus.files.wordpress.com/2011/07/esquema-2de2.png)

2de2.png

Una vez obtenido el gel bidimensional o mapa de expresión proteica hay que analizar la imagen. Actualmente poseemos programas informáticos (PD-QUEST, MELANIE, etc.) que facilitan mucho el estudio de este tipo de imágenes. De hecho, este *software* realiza un análisis completo de los mapas de expresión proteica y permite una posterior comparación entre diferentes mapas. Adicionalmente, existe la posibilidad de realizar comparaciones visuales con mapas proteómicos integrados en bases de datos disponibles en internet. En este sentido, la base de datos suiza *Swiss-Prot* (<http://www.expasy.ch>) es una de las más conocidas y empleadas (Fig. 1.14).

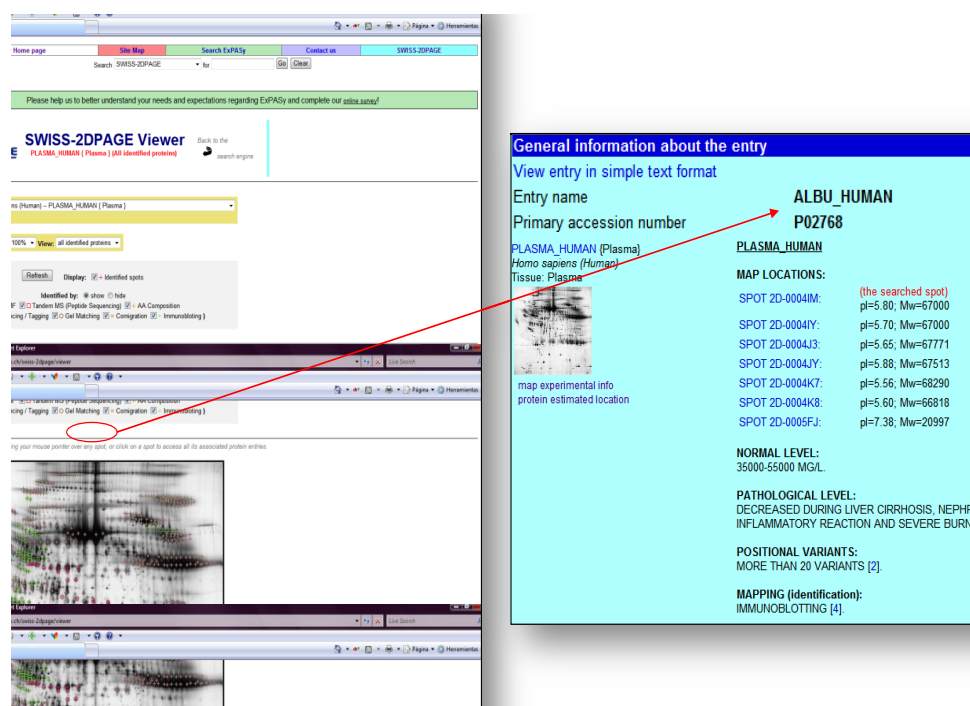


Figura 1.14. Ejemplo de ventanas utilizando la base de datos *Swiss-Prot*.

También, para el análisis cuantitativo de las diferentes proteínas del mapa proteómico disponemos de otras herramientas informáticas que facilitan la detección de variaciones en la expresión de las proteínas, siendo de especial utilidad en estudios patológicos. Un ejemplo es el programa denominado *QUANTITY-ONE* (Bio-Rad Laboratories).

1.7.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (“mass spectrometry”, MS) es una tecnología analítica de gran potencia^{209,210}, que requiere la conversión de los compuestos analizados a iones en fase gaseosa, los cuales se separan en función de su relación masa/carga (m/z), lo que permite averiguar su masa molecular con gran precisión²⁰⁹.

Las mediciones en la EM se llevan a cabo en fase gaseosa, con los *analitos* ionizados. Por definición, un espectrómetro de masas consiste en una fuente ionizante, un analizador de masa, que mide la ratio masa/carga (m/z) de los analitos, y un detector que registra el número de iones en cada valor de m/z . Las dos técnicas más utilizadas son las llamadas ESI (del inglés, *ElectroSpray Ionization*) y MALDI (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)^{211,212}. El analizador de masa es la tecnología fundamental del instrumento y en el terreno de la proteómica sus claves son la sensibilidad, la resolución, la precisión en la medida de la masa y la capacidad de generar espectros a partir de fragmentos peptídicos (en tándem o espectros MS/MS)^{209,213}.

Hay cuatro tipos básicos de analizadores de masa utilizados actualmente en proteómica: la trampa de iones (*ion trap*), el tiempo de vuelo o TOF (del inglés, *time of flight*), el cuádruplo y el FT-MS (del inglés, *Fourier Transform ion cyclotron*). Cada uno de ellos es diferente, variando en relación a su fuerza. Por lo general, MALDI se utiliza conjuntamente con analizadores TOF (MALDI-TOF) por su simplicidad, la precisión en la medición de la masa y su sensibilidad. Con este último método se obtiene la llamada *huella peptídica* como resultado del emparejamiento de la lista de masas experimentales con la lista de masas calculadas de todos los péptidos de una base de datos.

El proceso habitual consta de cuatro pasos. El primer paso consiste en el aislamiento de las proteínas de la muestra. La MS es menos sensible en el análisis de toda la proteína que en el estudio de los péptidos y, además, la masa de una proteína intacta por sí sola no es suficiente para su identificación. Por ello, las proteínas son degradadas en el segundo paso, generalmente con tripsina, que rompe dichas proteínas en la zona carboxílica de los residuos de lisina y arginina (a no ser que estén seguidos por una prolina), formando huellas peptídicas de péptidos predecibles. En el tercer paso los péptidos son ionizados tras el tratamiento con el láser, que les confiere una carga, y son separados según la ratio m/z . En el cuarto paso se obtiene el espectro de masas de péptidos y el ordenador genera una lista priorizada de estos péptidos por fragmentación y una serie de experimentos en tándem posteriores, que consisten en el aislamiento de un péptido dado, fragmentación por colisión con gas y recopilación de un espectro tándem o MS/MS (Fig. 1.15).

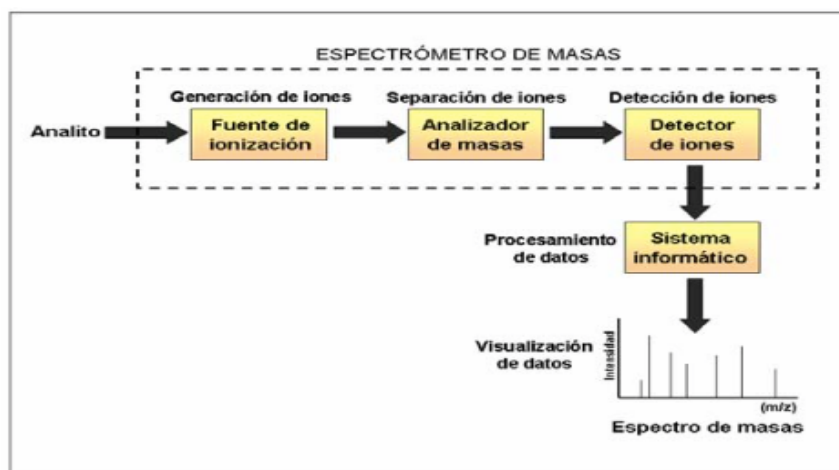


Figura 1.15. Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas. Existen tres componentes esenciales: la fuente de ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q, IT o una combinación de los anteriores en el caso de espectrómetros en tándem o híbridos) y el detector de iones. Las señales captadas por el detector son integradas en un sistema informático (externo al espectrómetro de masas) que genera los gráficos conocidos como espectros de masas.

La aplicación de la MS para el análisis cuantitativo y cualitativo del proteoma derivado de muestras complejas ha tenido un gran impacto en la comprensión de la función celular²¹⁴. La MS proporciona información sobre la estructura de la proteína: la masa peptídica y la secuencia de aminoácidos. Posteriormente, se utilizarán estos datos para identificarlas con las bases de datos. De esta manera, se determina el tipo y la localización de una modificación postransduccional, por ejemplo.

1.7.3. La era proteómica en la investigación vascular

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más importante de mortalidad en el mundo occidental y, además, se está produciendo un incremento progresivo también en las sociedades menos desarrolladas. La carga económica de estas enfermedades, incluyendo los gastos en cuidado de la salud y las pérdidas en productividad, se ha calculado en 45.6 billones de euros anuales en la Unión Europea²¹⁵ y de 142.5 billones de dólares en Estados Unidos²¹⁶.

La proteómica aplicada a las células vasculares o a las placas arterioscleróticas, cuya expresión proteica se modifica a lo largo de la evolución de la enfermedad, constituyen hoy en día una diana en la investigación en el área cardiovascular, siendo en este terreno una técnica de aplicación relativamente reciente.

La información que puede aportar la proteómica en la búsqueda de nuevos biomarcadores en las enfermedades cardiovasculares, sumada al análisis del fenotipo clínico, cambios metabólicos y al haplotipo genético, puede informar del perfil de riesgo cardiovascular para cada paciente^{217,218}. Sin embargo, actualmente a nivel cardiovascular la identificación de las modificaciones postraduccionales es prácticamente nula y menos aún se sabe sobre modificaciones en el nivel de expresión de diferentes isoformas de proteínas.

Probablemente, con la introducción de la proteómica, en pocos años el conocimiento de las enfermedades cardiovasculares aumente de forma considerable. En resumen, la proteómica tiene el potencial de revolucionar el modo de diagnosticar, determinar el riesgo y el pronóstico clínico así como las estrategias terapéuticas en individuos con enfermedades cardiovasculares. Incluso ya se ha creado el término *farmacoproteómica*, que consiste en el estudio de la respuesta farmacológica de un paciente en función de las proteínas que expresa. Sin embargo, todavía no hay muchos estudios que analicen los efectos de los fármacos en el proteoma^{219,220,221}.

2

HIPÓTESIS

*“Los grandes conocimientos engendran
las grandes dudas”
Aristóteles*

Dado que la mortalidad por causa cardiovascular constituye una de las principales causas de muerte del presente y el pasado siglo, y que los pacientes diabéticos son especialmente propensos a esta enfermedad, constituye un reto para la ciencia encontrar dianas de tratamiento que contribuyan a atajar esta gran pandemia.

Como se ha detallado previamente en la introducción, las alteraciones del metabolismo celular y el estrés oxidativo están directamente implicadas en la formación de la placa de ateroma; además, los pacientes diabéticos son especialmente propensos a desarrollar estas alteraciones y, por tanto, a la arterioesclerosis.

*Por otro lado, el factor Xa parece jugar un papel clave en el proceso de remodelación de los tejidos y la fibrosis y, además, parece estar aumentado en los pacientes diabéticos; por todo esto, **se postula que podría estar directamente implicado en las alteraciones del metabolismo celular y en el estrés oxidativo responsables de la formación de la placa de ateroma.** Si esto fuera así, el factor Xa constituiría una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la arterioesclerosis, y el rivaroxabán y otros inhibidores del factor Xa podrían emplearse más allá de su efecto anticoagulante.*

3

OBJETIVOS

*“Solo comprendemos aquellas
preguntas que podemos responder”*

Friedrich Nietzsche

Los objetivos de la presente tesis son:

- evaluar si FXa modifica el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético en las arterias femorales obtenidas de pacientes diabéticos tipo 2.

2.

- evaluar si FXa modifica el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en las arterias femorales obtenidas de pacientes diabéticos tipo 2.

- evaluar los efectos de la inhibición del factor Xa por rivaroxabán sobre el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético en las arterias femorales obtenidas de pacientes diabéticos tipo 2.

- evaluar los efectos de la inhibición del factor Xa por rivaroxabán sobre el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en las arterias femorales obtenidas de pacientes diabéticos tipo 2.

4

MATERIAL Y MÉTODOS

“Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre”

Leonardo Da Vinci

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente tesis se realizaron experimentos *in vitro* para estudiar el efecto del factor Xa sobre la pared vascular de pacientes diabéticos, observando los cambios en la expresión proteica en segmentos de arteria femoral superficial arterioesclerótica de dichos pacientes incubados de 3 formas diferentes: aislada, con FXa y por último con FXa y rivaroxabán. Con estas tres incubaciones diferentes se podría establecer la influencia del factor Xa sobre la expresión de proteínas de la pared arterial de arterias que presentan arterioesclerosis en pacientes diabéticos.

4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Los segmentos de arterial femoral superficial fueron obtenidos de 12 pacientes diagnosticados previamente de diabetes mellitus tipo 2 a los que se sometió a la amputación del miembro inferior debido a una isquemia crónica grado IV. La diabetes tipo 2 se definió de acuerdo a las guías clínicas del grupo de trabajo de la Federación Internacional de Diabetes²²².

Los pacientes fueron excluidos si estaban tomando medicación anticoagulante o antiagregante 10 días antes de la cirugía o si la causa de la amputación fue una enfermedad infecciosa.

La investigación fue llevada a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki, todos los sujetos dieron su consentimiento informado y el Comité Ético Institucional aprobó y dio su consentimiento para realizar el estudio.

4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las arterias femorales fueron cuidadosamente aisladas en quirófano procedentes del musculo cuádriceps del miembro amputado y en condiciones estériles tras la

realización de una amputación mayor. Cada fragmento fue cuidadosamente aislado para preservar el endotelio intacto. El aislamiento y manipulación de las muestras durante todo el proceso se realizaron en condiciones de esterilidad. Se mantuvieron en suero salino fisiológico durante su transporte al laboratorio (en una duración de unos 5 minutos).

4.3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARTERIAL FEMORAL SUPERFICIAL

Los segmentos de arteria se cortaron con bisturí en piezas de aproximadamente 5 mm de longitud y fueron incubadas por triplicado en placas de Petri con medio RPMI 1640 de la siguiente manera (Figura 4.1):

- a) control: sólo en medio RPMI.
- b) incubación con FXa: en medio RPMI y FXa en una concentración de 25 nmol /L.
- c) incubación con FXa y rivaroxabán: en medio RPMI con FXa en concentración de 25 nmol/L y rivaroxabán a una concentración de 50 nmol/L. El rivaroxabán fue añadido al medio 5 minutos antes que el FXa.

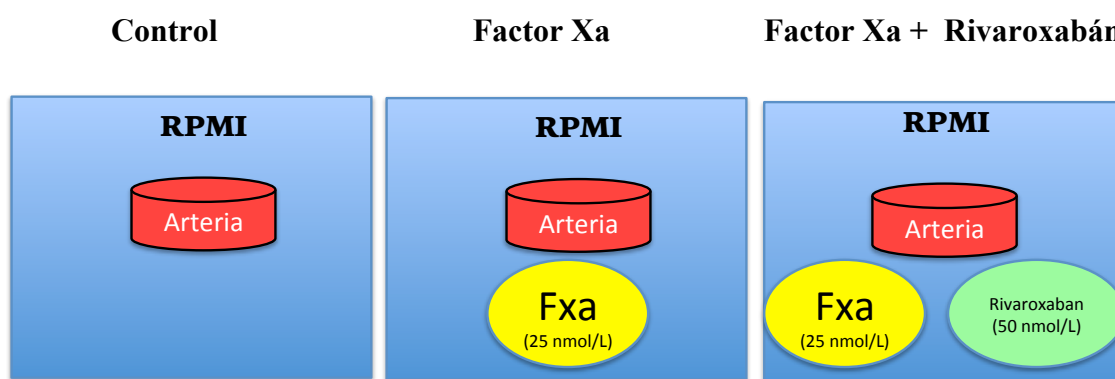


Figura 4.1. Esquema de incubación.

El medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 fue inicialmente diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión, pero con los suplementos adecuados tiene un amplio rango de aplicaciones en células de mamíferos.

El medio RPMI empleado pertenece a la compañía *Invitrogen Corporation: Gibco®* RPMI 1640 (nº catal.11835-063), sin rojo fenol, para evitar alteraciones posteriores en los análisis en los que se utilizan métodos colorimétricos. Este medio está constituido por la formulación basal estándar recogida en publicaciones previas²²³, suplementado con aminoácidos no esenciales y piruvato sódico. Además se suplementó con un 1% de suero de ternera fetal bovina (SFB) (al tratarse de tejidos requieren menos SFB que los cultivos celulares), 2×10^{-5} µg/l de penicilina y 2×10^{-5} µg/l de estreptomicina. La formulación del medio se indica en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Formulación del medio RPMI 1640 *Gibco®*

COMPONENTES	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mg/dl)	MOLARIDAD (mM)
AMINOÁCIDOS			
Glicina	75	10	0.133
L-Arginina	174	200	1.150
L-Asparagina	132	50	0.379
Ácido L-Aspártico	133	20	0.150
L-Cistina 2HCl	313	65	0.208
Ácido L-Glutámico	147	20	0.136
L-Glutamina	146	300	2.050
L-Histidina	155	15	0.0968
L-Hidroxiprolina	131	20	0.153
L-Isoleucina	131	50	0.382
L-Leucina	131	50	0.382
L-Lisina	146	40	0.274

4. MATERIAL Y MÉTODOS

L-Metionina	149	15	0.101
L-Fenilalanina	165	15	0.0909
L-Prolina	115	20	0.174
L-Serina	105	30	0.286
L-Treonina	119	20	0.168
L-Triptófano	204	5	0.0245
L-Valina	117	20	0.111
VITAMINAS			
Biotina	244	0.2	0.000820
Cloruro de colina	140	3	0.0214
A. pantoténico	477	0.25	0.000524
Ácido fólico	441	1	0.00227
i-Inositol	180	35	0.194
Niacinamida	122	1	0.00820
P-aminobenzoico	137	1	0.00730
Piridoxina	206	1	0.00485
Riboflavina	376	0.2	0.000532
Tiamina	337	1	0.00297
Vitamina B12	1355	0.005	0.0000037
SALES			
Nitrato de calcio	236	100	0.424
Sulfato magnésico	120	48.84	0.407
Cloruro potásico	75	400	5.33
Bicarbonato sódico	84	2000	23.81
Cloruro sódico	58	5300	91.38
Fosfato disódico	142	800	5.63
OTROS			
D-Glucosa	180	2000	11.11
Glutation reducido	307	1	0.00326
HEPES	238	5958	25.03

HEPES: ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperacinaEtanosulfónico.

La concentración de FXa se eligió de acuerdo con trabajos anteriores in vitro que demostraron que esta concentración de FXa fue capaz de estimular la producción de procolágeno y de inducir la proliferación de fibroblastos¹⁷⁵. Rivaroxabán (Bay 59-7939) fue adquirido por Bayer Health Care AG y la concentración elegida se basó también en estudios previos que demostraron que tal concentración de rivaroxabán inhibía completamente la actividad FXa²²⁴. Además, la concentración de rivaroxabán usada en los presentes experimentos se constató como clínicamente relevante, es decir, que fue capaz de modificar el tiempo de protrombina²²⁵.

Las incubaciones in vitro se realizaron durante 18 horas a 37°C, en atmósfera de 95% de oxígeno (O₂), 5% de dióxido de carbono (CO₂), y después se recogieron y almacenaron a -80°C hasta la realización de las determinaciones moleculares.

4.4. DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS MEDIANTE PROTEÓMICA

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la proteómica, que, como ya se ha indicado con anterioridad (ver apartado **PROTEÓMICA**), es una nueva tecnología que permite analizar la expresión de múltiples proteínas a la vez en una única muestra. En un estudio proteómico es necesario integrar una serie de tecnologías, como la 2-DE, el análisis de la imagen, la MS y la bioinformática, como se muestra a continuación.

4.4.1. Electroforesis bidimensional

La 2-DE es la base fundamental para el desarrollo de los mapas de expresión proteica o proteomas. Esta técnica permite separar las proteínas en dos dimensiones: el peso molecular y el punto isoeléctrico. Esta separación bidimensional de las proteínas da lugar a un mapa de expresión proteica en el que cada proteína y sus isoformas están

distribuidas en la coordenada formada por el peso molecular y el punto isoelectrico. Esta coordenada es única para cada proteína, es decir, es el documento de identidad de la misma.

4.4.1.1. Material utilizado

- Homogeneizador *Ultra-Turrax®* T8 (IKA®-Werke)
- Tampón de rehidratación
- *kit Pierce®* BCA Protein Assay
- Geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (*Bio-Rad ReadyStrip™*)
- Sistema PROTEAN® IEF cell (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%
- Sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Fixative Enhance Concentrate* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Kit Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Escáner UMAX POWERLOOK III
- *Software ScanMagic V 4.5*
- Programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*)

4.4.1.2. Preparación de las muestras

Las muestras de arteria fueron aisladas y homogeneizadas con el homogeneizador *Ultra-Turrax®* T8 (IKA®-Werke). Dicho homogeneizador es una unidad de dispersión para conseguir emulsiones y dispersiones con un alto rendimiento. El *Ultra-Turrax®* T8 (Fig. 4.2) es un instrumento de mano de alta calidad, con una potencia de hasta 100 watios y unas velocidades de 5000 a 25000 rpm. Gracias al

amplio rango de velocidades y que el elemento dispersor tiene un diámetro de 5-8 mm, incluso pequeñas cantidades se procesan y dispersan rápidamente.



Figura 4.2. Ejemplo del instrumento *Ultra-Turrax®* T8. Fuente: internet.

Las muestras se homogeneizaron en una solución tampón (*rehydration buffer*) que contenía un agente desnaturizante (urea), un agente detergente (CHAPS y anfolitos) y un agente reductor (ditiotreitól) en las concentraciones que se exponen a continuación (Tabla 4.2):

- Urea.....8 mol/l
- CHAPS w/v.....2%
- Ditiotreitól.....40 mmol/l
- Anfolitos Bio-Lyte (Laboratorios *Bio-Rad*, Hercules, Cal)...0.2%
- Azul de bromofenol w/v.....0.01%

Tabla 4.2. Componentes, función y concentración de la solución de rehidratación.

COMPONENTE	FUNCIÓN	CONCENTRACIÓN
Urea	Desnaturaliza y solubiliza las proteínas	8 M/l
Detergente (CHAPS)	Solubiliza las proteínas y ayuda a mantenerlas en solución durante la rehidratación y 2-DE	2%
Agente reductor (ditiotritol)	Rompe los puentes disulfuro en las proteínas	40 mM
Anfolitos	Ayudan a solubilizar las proteínas y a mantener el gradiente de pH entre 0.2-2%	0.2%

Después de la incubación en rueda giratoria durante 12 horas a 4° C, los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

4.4.1.3. Primera dimensión

La concentración de proteínas se estimó utilizando el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Se trata de una formulación basada en el ácido bicinonínico (BCA), compatible con detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación de las proteínas totales.

El principio del método del ácido bicinonínico (BCA), patentado por *Pierce Biotechnology*²²⁶ (Rockford, IL, USA), es similar al procedimiento de *Biuret*, en cuanto que ambos se basan en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción del Cu^{2+} en Cu^{1+} . La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. El BCA forma un complejo azul púrpura con el

Cu^{1+} por proteínas en medios alcalinos, de modo que permite monitorizar la reducción de Cu^{2+} por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm y de este modo cuantificar las proteínas. La estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de cuatro aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia generalmente a una proteína estándar común, como la albúmina bovina.

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry*. Además, tiene menos variabilidad que el método de *Bradford*. Entre otras características del ensayo BCA encontramos:

- Método colorimétrico, se lee a 562 nm
- Compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos
- Más rápido y fácil que el método de *Lowry*
- Todos los reactantes son estables a temperatura ambiente durante 2 años
- El rango de trabajo varía de 20 a 2000 $\mu\text{g/ml}$
- El complejo de color es estable
- Adaptable a microplatos
- Menor variación proteína-a-proteína que con los métodos de tinción
- Es aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con referencia al estándar, la albúmina bovina (Fig. 4.3).

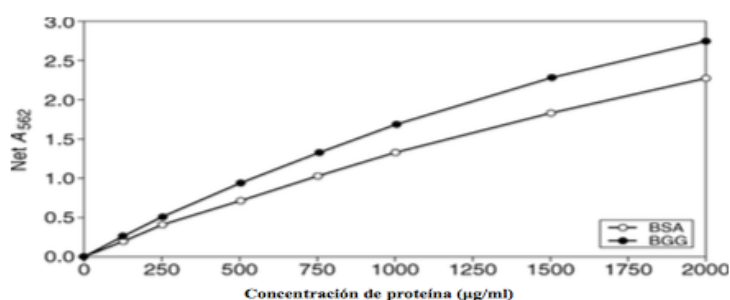


Figura 4.3. Ejemplo de curva de comparación de concentración de proteínas frente a la albúmina bovina.

BSA: albúmina de suero bovino. **BGG:** gammaglobulina bovina. Fuente: internet.

La cuantificación de las proteínas se realizó siguiendo los pasos que se indican a continuación:

1. Preparación de las diluciones estándar de BSA (albúmina de suero bovino). Las diluciones de BSA se prepararon a partir de ampollas de BSA de 2.0 mg/ml, según el siguiente esquema (Tabla 4.3):

Tabla 4.3. Diluciones de BSA indicando el volumen de disolvente, la relación volumen/fuente de BSA y la concentración final de BSA. BSA: albúmina de suero bovino.

VIAL	VOLUMEN DE DISOLVENTE	VOLUMEN/FUENTE DE BSA	CONCENTRACIÓN FINAL BSA
A	700 µl	100 µl del estándar	250 µg/ml
B	400 µl	400 µl del vial A	125 µg/ml
C	450 µl	300 µl del vial B	50 µg/ml
D	400 µl	400 µl del vial C	25 µg/ml
E	400 µl	100 µl del vial D	5 µg/ml
F	400 µl	0	0 µg/ml (blanco)

2. Preparación del reactivo de trabajo BCA

Se empleó como reactivo el *kit Pierce*[®] *BCA Protein Assay*. Para determinar el volumen total de reactivo de trabajo se empleó la siguiente fórmula: $(x \text{ estándar} + x \text{ muestras problema}) \times (n^{\circ} \text{ duplicados}) \times (\text{volumen de reactivo de trabajo por muestras} = 200 \text{ } \mu\text{l}) = \text{volumen total}$. El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes de reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicincinínico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con una parte de reagente B (sulfato cúprico 4%).

3. Se pipetearon 25 μl de cada estándar o muestra problema por triplicado en pocillos
4. Se añadieron 200 μl de reactivo de trabajo a cada pocillo y se mezcló el platillo en un agitador durante 30 segundos.
5. Se tapó el platillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos
6. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente
7. Se midió la absorbancia a 562 nm
8. Se restó la absorbancia de la muestra blanco al resto de muestras
9. Se preparó la curva estándar: en el eje de ordenadas la medida de absorbancia; en el eje de abscisas, la concentración conocida de BSA. A continuación, en esta curva se interpolan los valores obtenidos en el resto de muestras problema.

Para la primera dimensión de la 2-DE se cargaron muestras de 250 μg de proteína total en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un pH de 3 a 10 (*Bio-Rad ReadyStrip*[™]). El foco isoelectrico se realizó con el sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*) durante tres días y a temperatura ambiente (20°C). Este sistema está diseñado para llevar a cabo la primera dimensión y consiste en una fuente

de alimentación programable con una plataforma *Peltier* que mantiene la temperatura constante para asegurar la reproducibilidad. El rango de temperaturas varía desde 10 a 25 °C, lo que permite trabajar con un rango más amplio de muestras de proteínas y condiciones. Dicho sistema permite acomodar hasta 24 tiras de 7 cm o 12 de 17 cm para realizar el foco isoelectrico. Puede ser programado completamente para una rehidratación pasiva o activa (50 V). Las especificaciones técnicas se listan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*).

RENDIMIENTO	
Voltaje	50-10000 V, incrementos de 10 V
Corriente	0-2.4 mA, incrementos de 1.0 μ A
Potencia	0-24 W
PLATAFORMA <i>Peltier</i>	
Capacidad	24 tiras de 7 cm o 12 toras de 11,17,18 o 24 cm.
Temperatura de operación	10-25 °C
Dimensiones	28 x 30 x 14 cm

Como se ha publicado con anterioridad^{227,228}, los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas, seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50 μ A por gel²²⁹.

4.4.1.4. Segunda dimensión

En la segunda dimensión las proteínas de las tiras se separaron según su peso molecular en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico al 10% (SDS-PAGE) utilizando el sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*). Esta

unidad proporciona una gran área de separación de las proteínas, lo que permite analizar muestras con mayor carga y, finalmente, también obtener una mejor resolución respecto a los formatos de gel más pequeños. Las especificaciones técnicas se incluyen en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*).

SISTEMA PROTEAN® II XL	
Número de geles	1-4
Tamaño del gel	18.3 x 20 cm (altura x longitud)
TAMAÑO del PLATO	
Interno	20 x 20 cm
Externo	20 x 22.3 cm
Longitud del espaciador	22.3 cm
Volumen superior de tampón	350 ml
Volumen inferior de tampón	1.2 L
TIEMPOS para el SDS-PAGE	
Sin enfriamiento	5 h
Con enfriamiento	3.5 h

4.4.1.5. Tinción

Posteriormente, los geles fueron fijados en una solución con *Fixative Enhance Concentrate* (Laboratorios *Bio-Rad*), etanol y ácido acético en agua destilada durante 20 minutos. Después se utilizó una solución de sensibilización compuesta por acetato sódico y tiosulfato sódico en agua destilada y se lavaron dos veces de 10 minutos con agua destilada. Entonces los geles fueron teñidos con plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 25 minutos.

El *Silver Stain Plus* es un sistema rápido y sencillo para detectar proteínas en los geles de poliacrilamida tras la electroforesis. Esta tinción con plata es muy sensible, pudiendo detectar incluso cantidades de nanogramos de proteínas. El *kit Silver Stain Plus* contiene los siguientes componentes:

- Concentrado potenciador del fijador
- Solución de complejo de plata, que contiene NH_4NO_3 y AgNO_3
- Ácido tungstosilícico, compuesto por silicio y tungsteno ($\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$) y que a 20 °C es completamente soluble
- Formaldehído
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) como agente acelerador de la tinción
- Un bote de 1 L vacío

Para la correcta tinción de los geles los contenedores se limpiaron con 50% de ácido nítrico después del detergente de laboratorio. Además, las superficies de los geles estuvieron completamente sumergidas y se evitaron temperaturas superiores a 25 °C. Los geles teñidos se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada vez.

Es muy importante destacar que la tinción con plata utilizada fue compatible con posteriores pasos de MS. El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para seguidamente aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los geles alcanzaron el grado de tinción deseado se paró el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

4.4.1.6. Adquisición de imágenes y análisis

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software *ScanMagic V 4.5*. El análisis de la imagen se realizó utilizando el programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*) (Fig. 4.4). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas. A la intensidad del volumen de cada punto le fue sustraída la intensidad correspondiente al fondo y el volumen resultante fue normalizado *in situ* con el valor densitométrico correspondiente a la actina α .

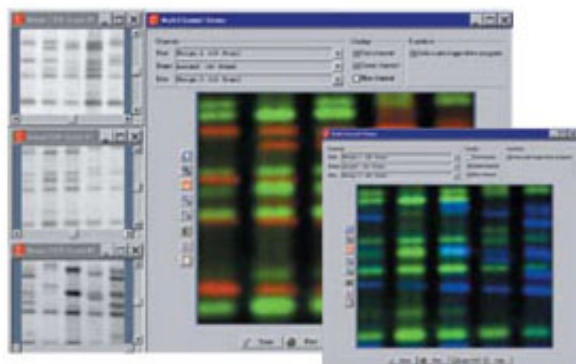


Figura 4.4. Ejemplo de pantalla de análisis con el programa *Quantity One*.

La identidad de cada punto se realizó por comparación con la base de datos *Swiss Prot* (ExPASy). La densidad de los puntos estudiados más importantes se confirmó con MS.

En el mapa proteómico de los segmentos arteria femoral superficial se analizaron densitométricamente y se identificaron por comparación con aquellos encontrados en la vena safena humana, publicado por *McGregor et al (2001)*²³⁰. Los *spots* en los que se observaron diferencias significativas se identificaron con MS.

4.4.2. Espectrometría de masas

La MS es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

4.4.2.1. Material utilizado

- Agua Milli-Q™ (Merk Millipore)
- Acetonitrilo (CH₃CN) al 100%
- Sistema SpeedVac® (Thermo Scientific)
- Ditioneritrol (C₄H₁₀O₂S₂)
- Bicarbonato amónico (NH₄HCO₃)
- Iodoacetamida (C₂H₄INO)
- Tripsina (Promega®)
- Ácido trifluoroacético (TFA, CF₃COOH)
- Puntas mmol-18 Zip (Millipore)
- Matriz de α-ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (Sigma)
- Placa de MALDI (Pro MS MALDI Genomic Solutions)
- 4700 Proteomic Analyzer (Applied Biosystem)
- Calibradores estándar (Applied Biosystem)

4.4.2.2. Método

Para la identificación de las proteínas de interés, los puntos se extrajeron manualmente de los geles utilizando un punzón para biopsias^{231,232}. La identificación de cada proteína se llevó a cabo extrayendo el mismo punto de interés en tres geles diferentes. La tinción de plata fue solubilizada y eliminada y los puntos fueron lavados

tres veces con agua *Milli-Q*[™] (*Merk Millipore*). Con este sistema se puede obtener agua ultra pura para este tipo de aplicaciones en el laboratorio, teniendo las siguientes características: un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25 °C y un nivel de carbonato orgánico total inferior a 10 ppb. Los sistemas *Milli-Q*[™] constan de varias etapas de purificación, cada una de ellas diseñada para eliminar una determinada gama de contaminantes. Se utilizó el módulo Gradient A10 (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Especificaciones del agua producida por el sistema *Milli-Q*[™] Gradient A10.

ESPECIFICACIONES	
Resistividad (MΩ.cm) a 25 °C	18.2
Nivel de COT (valores típicos)	1-5
Nivel de pirógenos (Eu/ml)	NE
Bacterias (UFC/ml)	<1
Partículas > 0.22 μm (P/ml)	<1
Caudal (L/min)	1.5

Después las muestras se incubaron con acetonitrilo (CH₃CN), utilizado como disolvente, al 100% durante 5 minutos y otros 30 minutos con ácido trifluoroacético (TFA, del inglés *TriFluoroAcetic acid*, con la fórmula CF₃COOH) al 5% y acetonitrilo al 50% y se secaron con un sistema *SpeedVac*[®] (*Thermo Scientific*).

Como se ha publicado previamente²³³, las muestras se redujeron con ditioeritritol (C₄H₁₀O₂S₂) en bicarbonato amónico (NH₄HCO₃) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida (C₂H₄INO), un inhibidor irreversible de todas las cisteína peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5

ng/ μ l de tripsina (*Promega*®) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37°C durante toda la noche.

La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4.

Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de 100 mmol/l de bicarbonato amónico. Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en TFA al 0.1%. Los péptidos se purificaron usando puntas mmol-18 *Zip* (*Millipore*). Para la MS se mezcló 1 μ l de los extractos purificados con 1 μ l de matriz de α -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*) en acetonitrilo al 50%. Un microlitro de esta mezcla se cargó en una placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*, del inglés *Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos partes: la fuente de iones y el detector. La fuente de ionización MALDI se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF-*Time of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

La MS se realizó utilizando el aparato 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*) y el análisis se efectuó en modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores estándar (*Applied Biosystem*).

Con el análisis en modo MS obtuvimos un espectro de masas denominado “huella peptídica” (Fig. 4.5), y algunos de los péptidos observados se analizaron en modo MS/MS, como se ha publicado anteriormente²³³. El modo MS/MS obtiene espectros de fragmentación de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. Los péptidos con una relación señal-ruido mayor de 20 se consideraron en la base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) para la identificación de la proteína. Para llevar a cabo dicha identificación se utilizó la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) como algoritmo para comparar los péptidos obtenidos por MS.

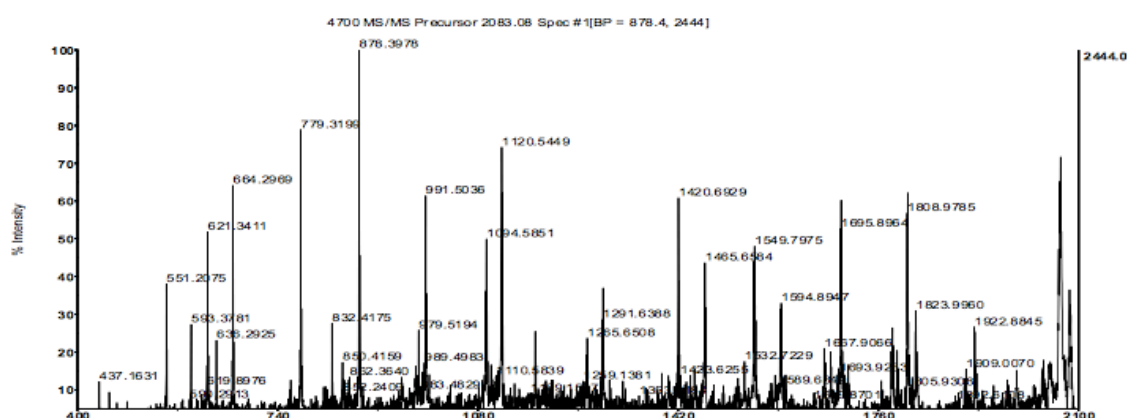


Figura 4.5. Ejemplo de espectro de masas moleculares de la anexina A2: huella peptídica.

La base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) es una potente máquina de búsqueda para identificar proteínas de bases de datos primarias. Nos permitió integrar todos los métodos de búsqueda probados: la huella peptídica o los fragmentos derivados del modo MS/MS.

Tras analizar la mezcla de péptidos mediante MS obtuvimos un conjunto de valores de masas moleculares que cruzamos con la base de datos *Mascot*. Para cada entrada en la base de datos de proteínas la máquina simula la rotura de los enlaces

específica de la tripsina utilizada en la digestión de las proteínas, calcula las masas de los péptidos previstos y compara el conjunto de valores de masas calculadas con los obtenidos de forma experimental. Para realizar la búsqueda se introdujo el espectro y después de un corto período de tiempo se recibieron los resultados.

4.4.3 Western blot

Se analizaron mediante *western blot* (WB) los niveles de expresión de proteínas como la triosa fosfato isomerasa, piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, carnitina palmitoiltransferasa (CPT) I y II (CPT-I y CPT-II) y las subunidades del complejo NADPH oxidasa gp91-phox, p47-phox y p67-phox como se detalla a continuación.

El WB, o *immunoblot*, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, como puede ser una mezcla compleja de proteínas (un extracto tisular). Mediante la electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

4.4.3.1. Material empleado

- Papel de filtro
- Tampón *Laemmli* (1x)

- SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfato PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis*) al 15%
- PBS para lavado
- Ácido bicinconínico (BCA)
- Azul de *Coomasie*
- Membrana de nitrocelulosa de polifluoruro de vinilideno (PVDF)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Tampón TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*)
- Anticuerpos primarios:
 - Anti-triosa-fosfato isomerasa (TIM (FL-249); sc-30145).
 - Anti-piruvato deshidrogenasa (PDK1 sc-7140)
 - Anti-lactato deshidrogenasa (sc-133123)
 - Anti-CPT-I y CPT-II (sc-20670 y sc-20526)
 - Anti- gp91-phox NADPH (sc-5827)
- Anticuerpos secundarios
 - IgG anti-ratón (*General Electric Healthcare®*)
 - IgG anti-conejo (*Santa Cruz Biotechnology®*)
 - IgG anti-cabra (*General Electric Healthcare®*)
- *Kit ECL plus* (*Amersham*, cod. RPN 2132)
- Marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*)

4.4.3.2. Preparación de las muestras

Los tejidos homogeneizados se solubilizaron en el tampón *Laemmli*, que contiene 2-mercaptoetanol. El tampón *Laemmli* está especialmente formulado para la

preparación de muestras proteicas en los geles de poliacrilamida. La formulación de dicho tampón es la siguiente, con un pH de 6.8, aproximadamente:

- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).....4%
- Glicerol.....20%
- 2-mercaptoetanol.....10%
- Azul de bromofenol.....0.004%
- M Tris-HCl.....125 mM

El agente detergente SDS dota a todas las proteínas de carga positiva en un intervalo regular, confiriendo a cada proteína la misma carga negativa total. De esta manera podemos separar las proteínas por su tamaño y no por su carga. El SDS también desnaturaliza las proteínas y sus subunidades para ayudar a la separación en base al tamaño y no a la forma. Al añadir glicerol en el tampón se incrementa la densidad, consiguiendo que la muestra descienda hasta el fondo y minimizando, por tanto, pérdidas de proteína en el tampón. El 2-mercaptoetanol se utiliza para reducir los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y permitir una adecuada separación no por forma sino por tamaño. A su vez, el azul de bromofenol sirve como indicador de la muestra de proteínas, haciendo más fácil su visualización. El *Tris*, es un componente habitual de los tampones y representa la abreviación del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, con la fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Posee una constante de disociación (pK_a) de 8.07 a 25 °C, lo que implica que dicho tampón va a tener una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así simularemos las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano.

4.5.3.3. Electroforesis en gel

Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida o SDS-PAGE al 15% (w/v).

En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína (20 µg/pocillo), calculado mediante la reacción colorimétrica basada en la reacción del BCA (*Pierce*) (Véase apartado 3.4.1.3. *Primera dimensión*). Para asegurarnos de que cargábamos la misma cantidad de proteínas en el gel, se elaboró otro gel paralelo con muestras idénticas que posteriormente se tiñó con azul de *Coomassie* (colorante derivado del fenilmetano, $C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$). La solución de tinción contenía los siguientes componentes:

- Azul de *Coomassie*.....0.5 g
- Metanol.....250 ml
- Ácido acético.....50 ml
- Agua destilada hasta 500 ml.

Tras dos horas en contacto con la solución se procedió a desteñir la membrana con ácido acético y metanol.

4.4.3.4. Transferencia y bloqueo de las proteínas

La transferencia de proteínas o *blotting* consiste en la inmovilización de dichas proteínas sobre membranas sintéticas para, a continuación, detectarlas mediante sistemas de tinción. En la técnica WB, después de la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

Cualquier procedimiento de *blotting* consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de las proteínas sobre la membrana, ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del *blot* con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del *blot* con anticuerpos secundarios, o reactivos, que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

El trabajo con proteínas fijadas sobre una membrana, en lugar de gel, tiene una serie de ventajas: son más rápidas de teñir y desteñir, se detectan cantidades menores de proteínas (pues se concentran en la superficie) y no se diluyen en todo el espesor del gel. Además, las membranas son más fáciles de manipular que el propio gel.

Las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia semihúmeda desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion®-P*, Millipore), para lo que se utilizó un tampón de transferencia (250 mM de glicina, 15% de metanol, 25 mM de *Tris* y agua destilada). Las membranas de tipo *Immobilion®-P* presentan una gran adsorción a las proteínas, por lo que se evita la pérdida de las mismas durante la transferencia. Su estructura es de poro abierto, lo que facilita el acceso a las proteínas unidas o eliminar las que no lo han hecho. Los poros tienen un diámetro de 0.45 μm , por lo que pueden utilizarse en la mayoría de los WB, especialmente para proteínas de > 20 kD (Fig. 4.6). Se sometieron a 20 V durante una hora. Posteriormente, las

membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con metanol seguido de un tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro.

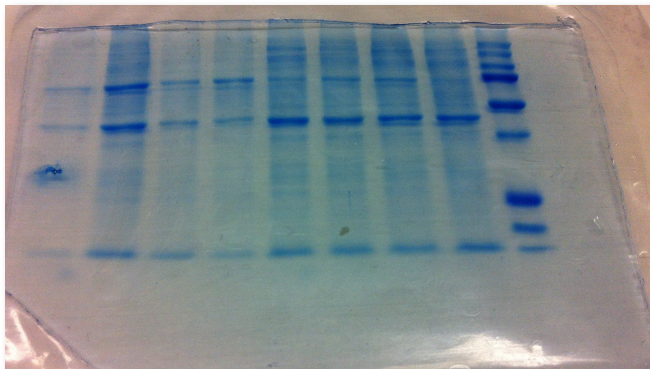


Figura 4.6. Imagen de una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion®-P*, Millipore).

Dado que la membrana necesita poder unirse a proteínas de forma inespecífica, dichas membranas fueron bloqueadas (se bloquearon los lugares de unión que quedaron libres tras la transferencia) durante toda la noche a 4 °C con un 5% (w/v) de leche en polvo no grasa en TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*). En caso contrario, los anticuerpos empleados en la detección, de naturaleza proteica, podrían unirse a ellos dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se forma con la proteína que se busca.

El TBS-T es un tampón utilizado para mantener el pH en un rango relativamente estrecho. La formulación utilizada fue la siguiente:

- Tris-HCl (pH 5.2).....20 mmol/l
- NaCl.....137 mmol/l
- Tween-20.....0.1%

El *Tris*, como se ha mencionado anteriormente, tiene una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así simular las condiciones fisiológicas del

animal o del cuerpo humano. Al añadir ácido clorhídrico (HCl) podemos ajustar el pH hasta 5.2. El NaCl proporciona una concentración de sal isotónica. El polisorbato 20 o monooleato de Polioxietileno Sorbitan, conocido comercialmente como *Tween* 20, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea utilizado como detergente y emulsionante. En el experimento actual, lo utilizamos para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos.

4.4.3.5. *Detección de proteínas*

Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 12 horas a 4° C con anticuerpos monoclonales específicos unidos a una enzima que, en presencia de su sustrato, catalizó una reacción colorimétrica, haciendo patente la unión con el antígeno (la proteína) y su localización. Las proteínas de interés y los anticuerpos (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU) utilizados se resumen en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Proteínas analizadas y sus anticuerpos específicos.

ENZIMA	ANTICUERPO	DILUCIÓN
Triosa fosfato isomerasa	TIM (FL-249): sc-30145	1:500
Piruvato deshidrogenasa	PDK1: sc-7140	1:1000
Lactato deshidrogenasa	sc-133123	1:100
CPT-I y CPT-II	sc-20670 y sc-20526	1:1000
gp91-phox NADPH	sc-5827	1:1000
gp47-phox NADPH	sc-14015	1:1500
gp67-phox NADPH	sc-7663	1:1500

La triosa fosfato isomerasa (TPI), enzima implicada en la glucólisis, cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Se utilizó el anticuerpo TIM (FL-249): sc-30145 (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU), una IgG policlonal de conejo obtenida contra los aminoácidos 1-249 (que representan la total longitud de la TPI de origen humano). Cada vial contiene 200 µg/ml de IgG en 1.0 ml de PBS con < 0.1% de sodio y 0.1 % de gelatina.

La piruvato deshidrogenasa es otra enzima que descarboxila al ácido pirúvico en la matriz de la mitocondria si hay suficiente suministro de oxígeno, rindiendo CO₂ y acetil coenzima A, que es el inicio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. En nuestro experimento, para la detección de la enzima se utilizó una IgG policlonal de cabra (PDK1: sc-7140, Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU) como anticuerpo específico.

Las CPT-I y CPT-II (carnitina palmitoiltransferasa I y II) son 2 enzimas que intervienen en el transporte de la acil-CoA al interior de la matriz mitocondrial, ya que la membrana mitocondrial interna es impermeable a los acil-CoA. Para la detección de estas enzimas se emplearon los anticuerpos sc-20670 para CPT-I y sc-20526 para CPT-II (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU), anticuerpos monoclonales de conejo y cabra respectivamente.

Las gp91-phox, gp47-phox y gp67-phox son las subunidades de la NADPH oxidasa. Esta enzima genera O₂⁻ y utiliza como sustrato al dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o al dinucleótido fosforilado de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) como donador de electrones. Para la detección de estas enzimas se empleó el anticuerpo policlonal IgG de cabra sc-5827 en la primera, IgG de conejo sc-14015 para la segunda, y por último IgG de cabra sc-7663 para la tercera (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU).

Las mismas muestras fueron también incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-beta-actina como control de carga (clon AC-74, Sigma®). Los controles de carga son anticuerpos usados para asegurar que la carga de proteínas en cada calle del gel es constante. Un anticuerpo control de carga detecta una proteína altamente conservada y presente en cantidades similares independientemente del tipo de muestra.

Las membranas se lavaron con PBS al 0.5% de *Tween* (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron de origen animal: Ig G anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra, conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:2000 (Fig. 4.7).

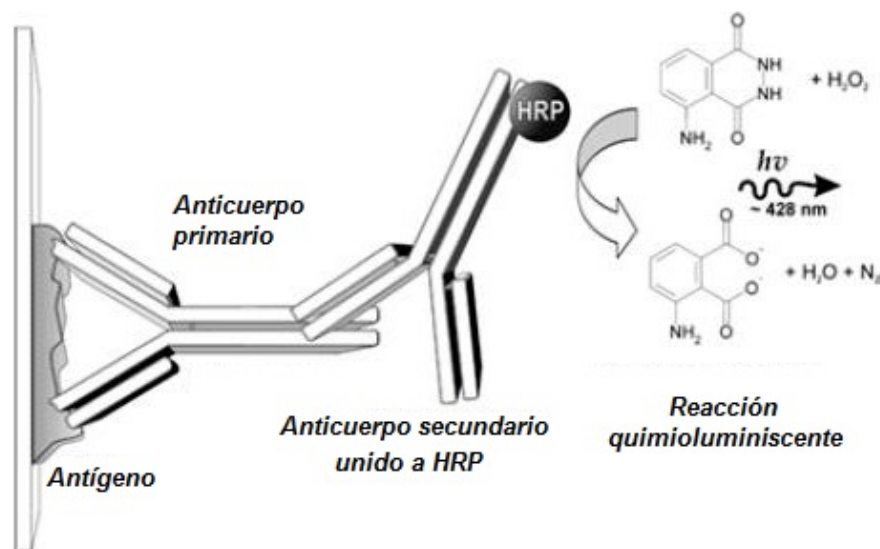


Figura 4.7. Detección de proteínas mediante la técnica *Western Blot*. **HRP:** peroxidasa de rábano.

4.4.3.6. Análisis

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada y se evaluaron por densitometría²³⁴. Para la detección de proteínas por quimioluminiscencia se utilizó

el sistema ECL[®] (*Amersham Biosciences*), previo lavado con PBS. Consiste en un sustrato Lumigen[®] PS-3 que es convertido en un éster de acridinio cuando es catalizado por la peroxidasa de rábano. El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite luz. El *kit* incluye la Solución A (sustrato que contiene el tampón *Tris*) y la Solución B (sustrato del acridinio con dioxano y etanol). Las dos soluciones se mezclan en una proporción 40:1 (Fig. 4.8).

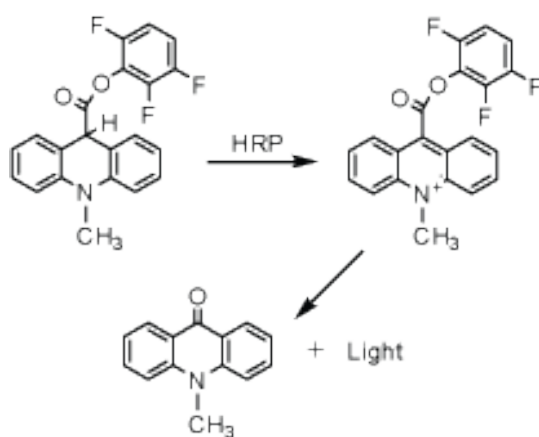


Figura 4.8. Esquema del proceso químico de la quimioluminiscencia.

Inmediatamente después de la oxidación se leyó a 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción.

Para la quimioluminiscencia se requirió la incubación de las membranas con el sustrato (ECL o luminol), para la posterior emisión de luminiscencia al ser expuesto al *reporter* que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida fue captada por una cámara CCD, que tomó una imagen digital del WB.

La imagen se analizó por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica (*Quantity One*[®], Laboratorios *Bio-Rad*). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis

de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas.

Se utilizaron marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*) para el cálculo de la masa molecular, para monitorizar el progreso en la electroforesis y como control positivo para el análisis. Existe una gran variedad de marcadores de peso molecular para numerosas proteínas. En nuestro experimento utilizamos marcadores preteñidos, que contenían una mezcla liofilizada de proteínas con un rango de peso molecular entre 10.000-250.000 Da.

4.5. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO DE LACTATO

El contenido de lactato presente en los segmentos de arteria femoral superficial fue cuantificado utilizando el Lactate Assay Kit (K607-100; *BioVision Research Products, USA*). En el ensayo el lactato sufre una serie de reacciones enzimáticas que generan color ($\lambda=570$ nm) y fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm). El color/fluorescencia es proporcional al contenido de lactato de la muestra. Las principales características del *Lactate Assay Kit* son:

- Detección basada en la absorbancia (570 nm) o fluorescencia
- Permite utilizar muestras de cultivos celulares y tisulares, orina, plasma, suero, así como otros fluidos.
- Puede detectar hasta 0,001-10 mM de lactato.
- Método sencillo con una duración de unos 40 minutos

El *Lactate Assay Kit* contiene los componentes que se especifican en la tabla a continuación:

Tabla 4.8. Componentes del *Lactate Assay Kit*.

COMPONENTES	100 ENSAYOS	COLOR	NÚMERO
Buffer <i>Lactate Assay</i>	25 ml	WM	K607-100-1
Sonda <i>Lactate</i>	200 μ l	Rojo	K607-100-2A
Mezcla enzimática <i>Lactate</i>	Liofilizado	Verde	K607-100-4
Lactato estándar (100 nmol/ μ l)	100 μ l	Amarillo	K607-100-5

Para medir la concentración de lactato mediante el ensayo colorimétrico se utilizaron 80 μ g de cada homogeneizado de proteínas y se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. Preparación de los reactivos:

- La sonda *Lactate* se descongeló a temperatura ambiente, evitando la exposición a la luz y la humedad.
- La mezcla enzimática *Pyruvate* se disolvió con 220 μ l del *buffer Lactate Assay*.

2. Protocolo del ensayo:

- Primero se preparó la curva estándar del ensayo colorimétrico, diluyendo el lactato estándar hasta 1 nmol/ μ l al añadir 10 μ l del estándar a 990 μ l del tampón. Posteriormente, se mezcló bien.
- Después se prepararon las muestras para el ensayo en 50 μ l/pocillo de tampón en un plato de 96 pocillos. Se extrajeron las muestras con un volumen cuatro veces mayor de tampón y se centrifugó hasta obtener el extracto de lactato.

- Para cada pocillo se preparó un total de 50 μ l de *Reaction Mix*, que contenía los siguientes componentes: 46 μ l de tampón, 2 μ l de sonda y 2 μ l de mezcla enzimática. Esta cantidad se añadió a cada pocillo con las muestras.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando la luz.
- Se midió a 570 nm en un microplato de lectura.
- El cálculo de la cantidad de lactato se realizó utilizando la siguiente fórmula: $C=La/Sv$ (nmol/ μ l o mM), donde *La* era la cantidad de lactato (nmol) de la muestra en relación con la curva estándar y *Sv* era el volumen de la muestra (μ l) añadido en el pocillo.

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACONITASA

La actividad aconitasa en los segmentos de arteria femoral superficial fue cuantificada utilizando el *Aconitase Activity Colorimetric Assay Kit* (K716-100; *BioVision Research Products*, USA). En el ensayo, el citrato se convierte en isocitrato por la aconitasa, convirtiendo una sonda casi incolora en una forma intensamente coloreada ($\lambda = 450$ nm). El color es proporcional a la actividad aconitasa de la muestra. Las principales características del *Aconitase Activity Colorimetric Assay Kit* son:

- Detección basada en la absorbancia (450 nm) o fluorescencia
- Permite utilizar muestras de cultivos celulares y tisulares, orina, plasma, suero, así como otros fluidos.
- Método sencillo con una duración de unos 40 minutos

El *Aconitase Activity Colorimetric Assay Kit* contiene los componentes que se especifican en la tabla a continuación:

Tabla 4.9. Componentes del *Aconitase Activity Colorimetric Assay Kit*.

COMPONENTES	100 ENSAYOS	COLOR	NÚMERO
Buffer <i>Assay</i>	30 ml	WM	K716-100-1
Sustrato (líoofilizado)	1 vial	Azul	K716-100-2
Desarrollador (líoofilizado)	1 vial	Morado	K716-100-3
Mezcla enzimática	200 µl	Verde	K716-100-4
Cisteína- HCl (líoofilizada)	1 vial	Rojo	K716-100-5
(NH ₄) Fe (SO ₄) ₂ Líoofilizado	1 vial	Marrón	K716-100-6
Isocitrato estándar (100 mM)	100 µl	Amarillo	K716-100-7

Para medir la actividad aconitasa mediante el ensayo colorimétrico se utilizaron 80 µg de cada homogeneizado de proteínas y se siguieron las instrucciones del fabricante:

1.- Preparación de los reactivos:

- Todo el kit se descongeló a temperatura ambiente, evitando la exposición a la luz y la humedad.
- El sustrato se disolvió con 220 µl de agua destilada.
- El desarrollador se disolvió con 1.1 ml del *Buffer Assay*.
- Para la preparación de la solución activadora de aconitasa: se disolvieron la cisteína- HCl y el (NH₄) Fe (SO₄)₂ con 0.5 ml del *Buffer Assay* por separado.

Posteriormente se mezclaron 0.1 ml de cada una de las mezclas previas.

Todos los reactivos se mantuvieron en hielo durante el ensayo, salvo el *Assay Buffer*, que se mantuvo a temperatura ambiente.

2.- Protocolo del ensayo:

- Preparación de las muestras: se homogeneizó el fragmento de arteria con 0.1 ml del *Assay Buffer*, y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante para su uso posterior en la muestra aconitasa. Se

añadieron 10 µl de solución de activación a 100 µl de la muestra y se incubaron en hielo durante 1 hora para activar la aconitasa.

- Después se prepararon las muestras para el ensayo en 50 µl/pocillo.
- Para la curva estándar de isocitrato, se diluyeron 10 µl del isocitrato con 490 µl del tampón del ensayo para preparar 2 mM de solución estándar de isocitrato. Se añadieron 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µl de solución estándar de isocitrato 2 mM en una placa de 96 pocillos por duplicado para generar 0, 4, 8, 12, 16, 20 nmol de isocitrato estándar.
- Cada pocillo se preparó un total de 50 µl de *Reaction Mix*, que contenía los siguientes componentes: 46 µl de tampón, 2 µl de la mezcla enzimática y 2 µl de sustrato. Esta cantidad se añadió a cada pocillo con las muestras.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando la luz.
- Se midió a 470 nm en un microplato de lectura.
- El cálculo de la actividad aconitasa se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad aconitasa} = \frac{B}{TXV} \times \text{el factor de dilución de la muestra}$$
(nmol/min/ml=mU/ml), donde B era la cantidad de isocitrato de la curva estándar (nmol), T era el tiempo de incubación (minutos) y V fue el volumen de muestra pretratada que se añadió al pocillo (ml).

4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACETIL COENZIMA A

El contenido de acetil coenzima A presente en los segmentos de arteria femoral superficial fue cuantificado utilizando el *Human Acetyl CoA ELISA Kit* (Shanghai Qayee biotecnología Co., Shanghai, China). En este inmunoensayo, la acetil coenzima A se detecta mediante un anticuerpo que se enlaza a una enzima capaz de generar un cambio de color, el cual se mide. La fluorescencia es proporcional al contenido de acetil

CoA de la muestra. Las principales características del *Human Acetyl CoA ELISA Kit* son:

- Detección basada en la fluorescencia.
- Permite utilizar muestras de cultivos celulares y tisulares, orina, plasma, suero, así como otros fluidos.
- Puede detectar de 7.8 a 500 ng/ml de Acetil CoA.
- Método sencillo con una duración de unos 120 minutos.

El *Human Acetyl CoA ELISA Kit* contiene los componentes que se especifican en la tabla a continuación:

Tabla 4.10. Componentes del *Human Acetyl CoA ELISA Kit*

COMPONENTES	96 ENSAYOS
<i>Solución estándar (500 ng/ml)</i>	0.6 ml
Diluyente para el estándar	6.0 ml
Diluyente para la muestra	6.0 ml
Reactivo conjugado con peroxidasa	10.0 ml
Solución para lavar	25 ml
Solución de cromógeno A	6.0 ml
Solución de cromógeno B	6.0 ml
Solución de parada	6.0 ml
Selladores de microplacas	2
96 pozillos	8-12 tiras

Para medir el contenido de acetil coenzima A mediante este ensayo también se utilizaron 80 µg de cada homogeneizado de proteínas y se siguieron las instrucciones del fabricante:

1.- Preparación de los reactivos:

- Todos los reactivos están listos para su uso salvo el estándar y la solución de lavado, que se diluyeron a una concentración de 1:20 con agua destilada.
- A la muestra de tejido se le añadió el tampón PBS para un pH 7.2-7.4. Se congeló con nitrógeno líquido y se guardaron las muestras mezcladas a -2-8 °C. Se centrifugaron a 2000-3000 rpm durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante.

2.- Protocolo del ensayo:

- Se prepararon pocillos en blanco, pocillos estándar y pocillos con la muestra, por triplicado. En los pocillos en blanco no se añadió la muestra ni el estándar. En los pocillos estándar se añadieron 50 µl de la solución estándar, y a los de la muestra 40 µl de la muestra preparada previamente con un factor de dilución de 5.
- Posteriormente se añadieron 100 µl de peroxidasa de rábano en cada pocillo (excepto en los en blanco). Se selló la placa y se agitó, incubándola 60 minutos a 37 °C.
- Se desechó el exceso de líquido, se secó y se añadió a cada pocillo el líquido para lavar diluido, mezclando y agitando durante 30 segundos. De nuevo se quitó el exceso de líquido y se seco, repitiendo esta operación 5 veces.
- Se añadieron 50 µl de solución de cromógeno A en cada pocillo, y posteriormente otros 50 µl de solución de cromógeno B. Se agitó y se incubó 10 minutos a 37 °C apartándolo de la luz.
- Para parar la reacción, se añadieron 50 µl de solución de parada en cada pocillo, cambiando el color de azul a amarillo inmediatamente.

- Para realizar la medición, se tomaron los pocillos en blanco como el cero midiendo su absorbancia a 450 nm (habiendo pasado 15 minutos desde el paso anterior), mediante una curva de regresión lineal.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos densitométricos, tanto proteómicos como de los WB, se expresaron en unidades arbitrarias de densitometría (UA), que son valores relativos de una unidad de medida mostrando el ratio de una determinada cantidad de sustancia, intensidad u otras cantidades respecto a un valor de referencia. El valor de referencia se establece en el laboratorio y sirve como referencia a múltiples medidas realizadas en un entorno similar. Dado que las UA expresan el ratio entre una medida y la referencia, son cantidades adimensionales.

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., CA, USA). Para determinar el nivel de significación estadística se utilizó el test de *Wilcoxon*. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

5

RESULTADOS

*“No mires nunca de dónde vienes,
sino a dónde vas”
Pierre Augustin Beaumarchais*

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS.

La Tabla 5.1 muestra las características clínicas de los pacientes incluidos. Todos ellos presentaban diabetes mellitus y no estaban sometidos a ningún tratamiento antiplaquetario y / o anticoagulante por lo menos 10 días antes de la obtención de la arteria femoral.

Tabla 5.1. Características de los pacientes incluidos.

Parámetros	Pacientes (n=12)
Edad (años)	73.8 ± 2.75
Hombre/mujer	11/1
HbA1c (%)	7.90±1.62
Factores de riesgo (%)	
Hipertensión	9/12 (75%)
Dislipemia	4/12 (33%)
Diabetes mellitus	12/12 (100%)

5.2. EFECTO DE FXA EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA PARED ARTERIAL FEMORAL

Se identificaron las siguientes proteínas y sustratos:

- Triosafosfato isomerasa.
- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (isoforma 1).
- Lactato deshidrogenasa.

- Lactato.
- Piruvato deshidrogenasa.
- Acil-CoA deshidrogenasa.
- Acetil- CoA.
- Actividad aconitasa.
- Subunidad M de la creatina-kinasa

En el análisis proteómico, los puntos estudiados fueron los que al menos se expresaron en el 80% de los geles 2DE dentro de cada grupo del experimento. Cuando se observaron diferencias significativas entre los distintos puntos de los controles y la pared vascular incubada con FXa, se confirmó la identificación de las proteínas con MS. En la Tabla 5.2 se detallan las características de las proteínas identificadas mediante MS.

Tabla 5.2. Relación del péptido asociado con la proteína detectada y el método seguido para identificar las proteínas de la pared vascular.

RUTA METABÓLICA	PROTEÍNA	PÉPTIDO ASOCIADO	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	SECUENCIA CUBIERTA (%)
Glucolisis aerobia	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	LISWYDNEFGYSNR	MS/MS	4
	Triosafosfato isomerasa - Isotipo 1	LPADTEVVCAPPTAYIDFAR/DLGATW VVLGHSER/HIFGESDELIGQK/VVFEQT K/TATPQQAQEVHEK/CNVSEGVAQCT R	MS	31

	- Isotipo 2	AIAGNWKNHNTIDESVK/VGAKNNYF EEKGAFTGEVSPLMLEK/ETDQTVNK/E NGVTEEVVSK/LVIAYEPIWAIGTGK/A NDFSAIVNYK	MS	34
Glucolisis anaerobia	Cadena C de la L-lactato deshidrogenasa	LIENLIEEDKISQR	MS/MS	4
Vía de la creatinina-kinasa	Cadena M de la creatinin kinasa	DLFDPIIQDRHGGFKPTDK/GGDDLDPN YVLSSR/GYTLPPHCSR/GKYYPLK/GI WHNDNKSFLVWVNEEDHLR/FEEILTR /GTGGVDTAAGVAFDISNADR	MS	25
Estrés oxidativo	Aldehído deshidrogenasa - Isotipo 1	KTFPVNPSTGEVICQVAAGDKEDVDR AVK/YYAGWADK	MS+MS/MS	7
	- Isotipo 2	TFPTVNTSTGEVIUVAEGSKEDVDK/V AFTGSTEVGHLIQVAAGSSNLK	MS+MS/MS	9

MS: espectrometría de masas. MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

5.2.1. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la glucolisis aerobia y anaerobia.

En arterias femorales incubadas con FXa, la expresión de dos isoformas de la proteína triosafosfato isomerasa se aumentó en comparación con las arterias incubadas bajo condiciones de control (Tabla 5.3). Esta mayor expresión observada en las arterias femorales incubadas con FXa se confirmó adicionalmente mediante experimentos de Western blot (Figs. 5.1A y 5.1B).

Tabla 5.3. Niveles de expresión de la triosafosfato isomerasa: control y FXa.

TRIOSA FOSFATO ISOMERASA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)
Isoforma 1	7.80±2.46	13.34±3.68*
Isoforma 2	8.20±3.12	29.75±6.60*

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0.05$ con respecto al control.

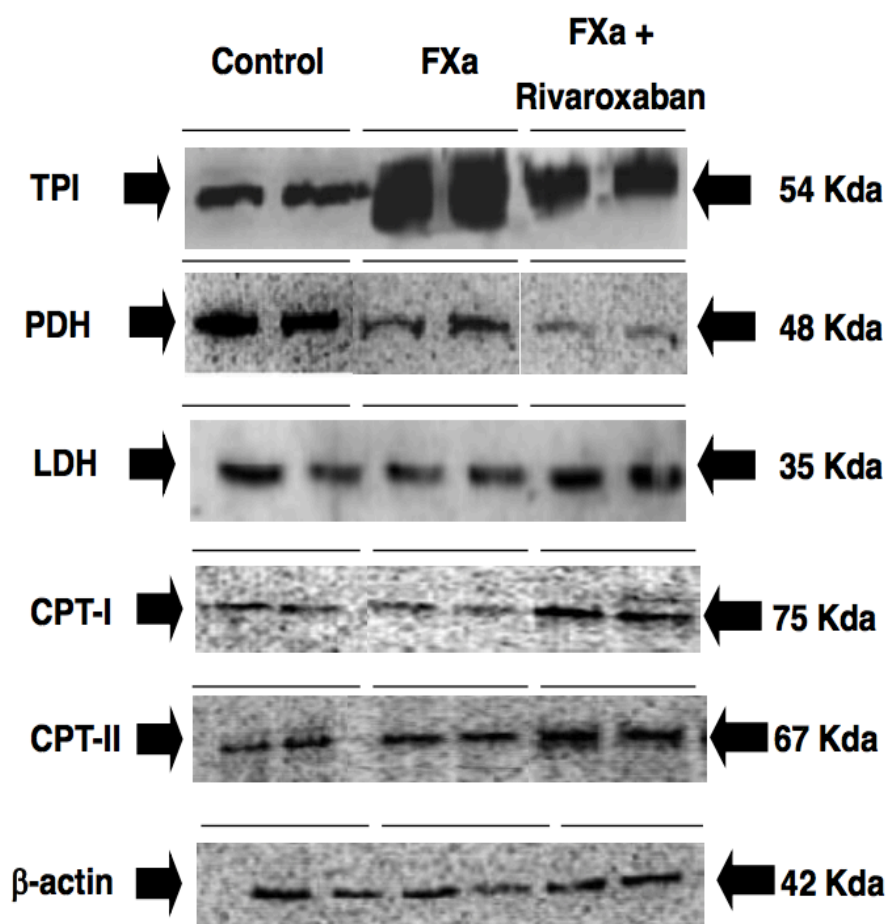


Fig. 5.1A. Western blots representativos de triosafosfato isomerasa (TPI), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato deshidrogenasa (PDH) y carnitina palmitoiltransferasa I y II (CPT-I y CPT-II). La expresión de β-actina se utilizó como control de carga de proteína. A la derecha observamos el peso de cada proteína.

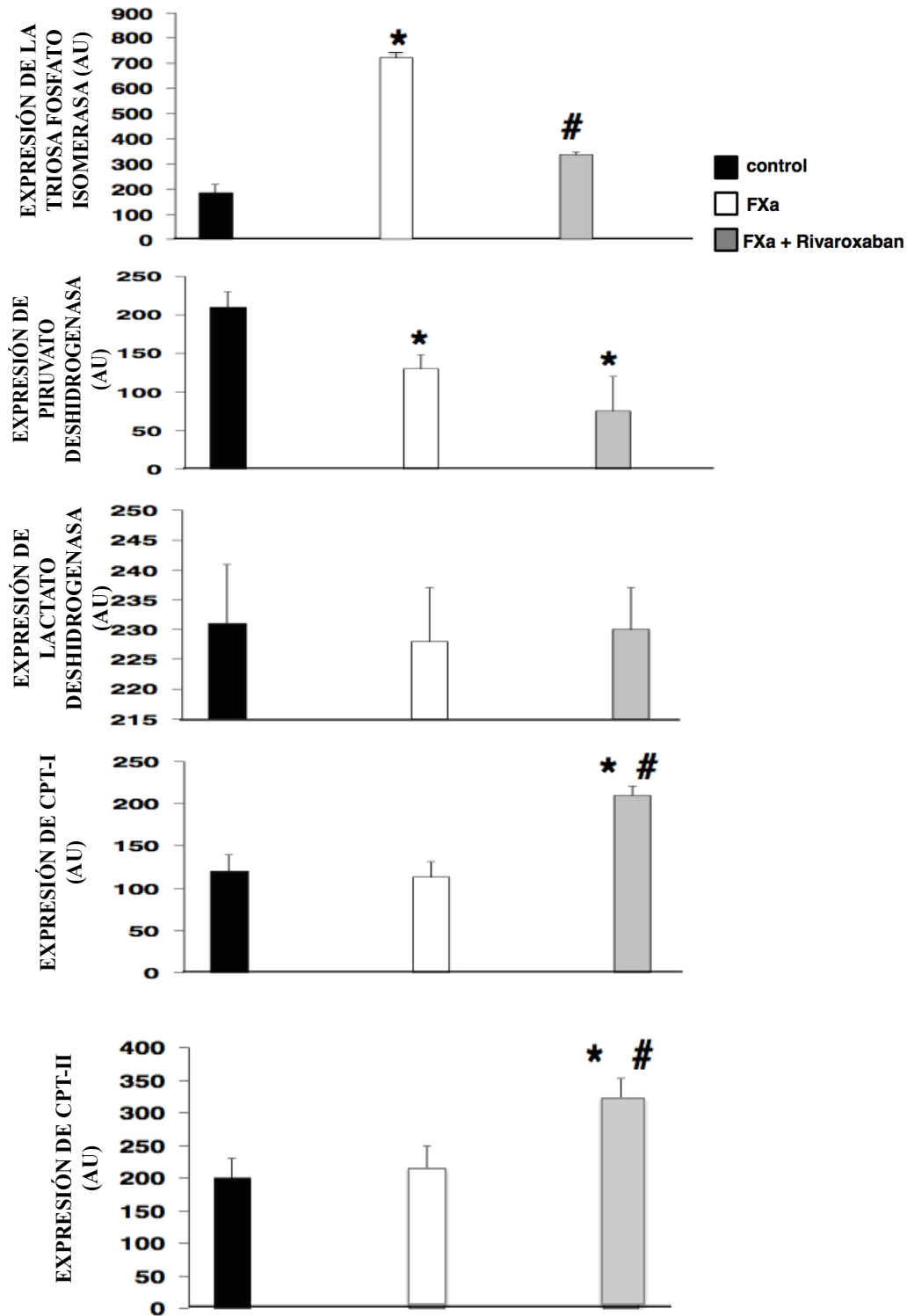


Fig. 5.1B. Los gráficos de barras muestran el análisis densitométrico en unidades arbitrarias (AU) de todos los Western blots. Los valores densitométricos se representan como media \pm DE. * $P < 0,05$ con respecto al control. # $P < 0,05$ con respecto a solo FXa.

Por otra parte, la expresión de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isoforma 1 también fue mayor en las arterias femorales incubadas con FXa que en el control (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Niveles de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa: control y FXa.

GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DH	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)
Isoforma 1	8.91±3.12	19.28±5.35*
Isoforma 2	28.4±9.13	19.23±6.27
Isoforma 3	39.08±16.05	33.45±14.79

DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0.05$ con respecto al control.

El análisis proteómico también reveló que la expresión de lactato deshidrogenasa fue similar en los segmentos arteriales incubados con FXa y en el grupo control (Tabla 5.5). También se confirmó por análisis de Western-blot (Figs. 5.1A y 5.1B).

Tabla 5.5. Niveles de expresión de la lactato deshidrogenasa: control y FXa.

PROTEÍNA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)
Lactato DH	17.20±5.59	16.14±3.77

DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0.05$ con respecto al control. No estadísticamente significativo en este caso.

La expresión de piruvato deshidrogenasa (enzima implicada en la conversión de piruvato en acetil-CoA) determinada por Western blot se redujo significativamente en las arterias incubadas con FXa con respecto al control (figuras 5.1A y 5.1B).

5.2.1.1. Determinación del contenido de lactato y de acetil-CoA.

El contenido de lactato en las arterias incubadas con FXa fue similar al control (contenido de lactato en nmol / mg de proteína: Control: 17.04 ± 1.42 ; FXa: 15.92 ± 2.31 ; pNS) (Tabla 5.6).

Sin embargo, el contenido de acetil-CoA en las arterias femorales incubadas con FXa fue mayor que la observada en condiciones de control (contenido de acetil-CoA en pmol / mg de proteína: control: 2.02 ± 0.39 ; arterias incubadas con FXa: 5.20 ± 0.67 p <0.05). (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Determinación del contenido de lactato y de acetil-CoA: control y FXa.

COMPUESTO	CONTROL	FACTOR XA
Lactato (nmol/mg prot)	17.04 ± 1.42	15.92 ± 2.31
Acetil CoA (pmol/mg prot)	2.02 ± 0.39	$5,20 \pm 0,67^*$

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media \pm DE. * p<0.05 con respecto al control.

5.2.2. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la betaoxidación de ácidos grasos.

Dos isoformas de los precursores mitocondriales de acil-CoA deshidrogenasa, enzima implicada en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga, fueron

identificadas en la pared arterial femoral, aunque ninguna de ellas fue modificada por FXa (Tabla 5.7). Por otra parte, el nivel de expresión de las proteínas de carnitina palmitoil transferasa I y II (CPT-I y CPT-II) también se determinó por Western Blot y no fueron significativamente diferentes entre las arterias incubadas con FXa y el grupo control (figuras 5.1A y 5.1B).

Tabla 5.7. Niveles de expresión de precursores mitocondriales de acil-CoA deshidrogenasa: control y FXa.

PM DE ACIL- CoA DH	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)
Isoforma 1	6.40±1.91	9.79±3.54
Isoforma 2	5.22±1.46	5.39±1.42

PM: precursor mitocondrial. DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0.05$ con respecto al control. No estadísticamente significativo en este caso.

5.2.3. Determinación de la actividad aconitasa: ciclo de Krebs.

En el ciclo del ácido tricarboxílico, el citrato se convierte en isocitrato por la actividad aconitasa. En las arterias femorales, FXa redujo significativamente la actividad de la aconitasa en comparación con el control (Fig. 5.2).

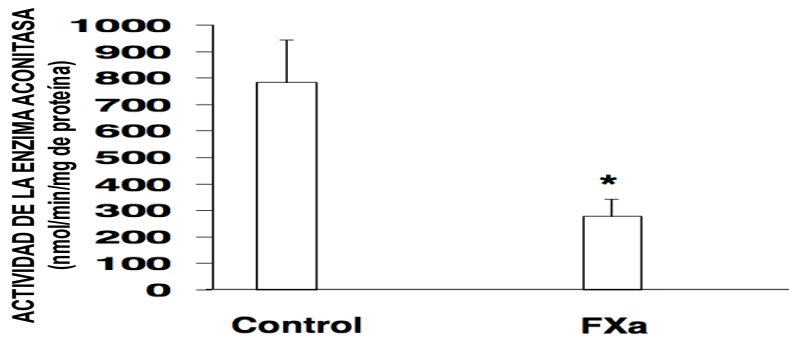


Figura 5.2. Los gráficos de barras muestran la actividad de la aconitasa en las arterias femorales de pacientes diabéticos, incubadas en presencia y ausencia de FXa. Los resultados se representan como media \pm DE. * $P < 0,05$ con respecto al control.

5.2.4. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la vía de la creatina-kinasa.

El análisis proteómico también mostró un nivel de expresión más alto de la subunidad M de la creatina-kinasa en las arterias femorales incubadas con FXa que en el control (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Niveles de expresión de la subunidad M de la creatinin-kinasa: control y FXa.

PROTEÍNA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)
Subunidad M de creatinin-kinasa	13.39 \pm 4.37	33.96 \pm 7.96*

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media \pm DE. * $p < 0.05$ con respecto al control.

El nivel de expresión de otras proteínas identificadas relacionadas con el metabolismo energético no fue diferente entre el control y las arterias incubadas con FXa (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Niveles de expresión de otras proteínas: control y FXa.

PROTEÍNA	CONTROL (AU)	FACTOR Xa (AU)
Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa	18.32±7.6	19.65±6.43
Fosfoglicerato mutasa	12.87±4.21	14.94±9.87
Fosfoglicerato kinasa		
Isoforma 1	16.20±4.64	16.00±6.31
Isoforma 2	10.88±4.04	9.60±3.23
Alfa enolasa	13.78±3.48	13.06±4.84
Gamma enolasa	15.48±4.24	16.57±4.15

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0.05$ con respecto al control. No estadísticamente significativo en estos casos.

5.3. EFECTOS DE RIVAROXABÁN SOBRE LAS MODIFICACIONES INDUCIDAS POR FXa EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.

5.3.1. Efecto sobre la expresión de proteínas relacionadas con la glucólisis aerobia y anaerobia.

La adición de Rivaroxabán a las arterias femorales incubadas con FXa reduce el nivel de expresión de las isoformas de triosafosfato isomerasa 1 y 2 con respecto a la incubación sólo con FXa (Tabla 5.10 y las figuras 5.1A y 5.1B).

Tabla 5.10. Niveles de expresión de la triosafosfato isomerasa: control, FXa y FXa+rivaroxabán.

TRIOSA FOSFATO ISOMERASA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)	FACTOR XA + RIVAROXABÁN (AU)
Isoforma 1	7.80±2.46	13.34±3.68*	6.23±1.79#
Isoforma 2	8.20±3.12	29.75±6.60*	13.55±5.82#

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * p<0.05 con respecto al control. # p<0.05 con respecto a FXa solo.

El nivel de expresión de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isoforma 1 también se redujo en las arterias femorales incubadas con Rivaroxabán + FXa en comparación con FXa solo, sin ser estadísticamente diferente con respecto al control (sí con respecto a FXa solo) (Tabla 5.11).

Tabla 5.11. Niveles de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa: control, FXa y FXa+rivaroxabán.

GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DH	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)	FACTOR XA + RIVAROXABÁN (AU)
Isoforma 1	8.91±3.12	19.28±5.35*	7.19±2.71#
Isoforma 2	28.4±9.13	19.23±6.27	26.46±13.98
Isoforma 3	39.08±16.05	33.45±14.79	20.10±13.26

DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * p<0.05 con respecto al control. # p<0.05 con respecto a FXa solo.

En la pared arterial femoral diabética, la adición de rivaroxabán a FXa no modificó tampoco la expresión de lactato deshidrogenasa (tabla 5.12); sin embargo, en las arterias femorales incubadas con FXa + rivaroxabán, la expresión de piruvato deshidrogenasa quedó reducida con respecto al control e incluso esta reducción tendió a ser más marcada que la observada con solo FXa (figuras 1A y 1B).

Tabla 5.12. Niveles de expresión de la lactato deshidrogenasa: control, FXa y FXa+rivaroxabán.

PROTEÍNA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)	FACTOR XA + RIVAROXABÁN (AU)
Lactato DH	17.20±5.59	16.14±3.77	15.84±4.83

DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0.05$ con respecto al control. # $p < 0.05$ con respecto a FXa solo. No estadísticamente significativo en este caso.

5.3.1.1. Determinación del contenido de lactato y de acetil-CoA.

El contenido de lactato en comparación con el control y con las arterias incubadas con FXa no se modificó tras la adición de rivaroxabán (contenido de lactato en las arterias femorales incubadas con FXa+rivaroxabán: 18.52 ± 2.89 nmol / mg proteína) (Tabla 5.13).

Por otra parte, el contenido de acetil-CoA en las arterias femorales incubadas con FXa + rivaroxabán fue similar al control y se redujo significativamente con respecto a las arterias incubadas sólo con FXa (contenido de acetil-CoA: rivaroxabán + FXa: 1.39 ± 0.28 pmol / mg proteína arterial; $p < 0.05$ con respecto a FXa solo) (Tabla 5.13).

Tabla 5.13. Determinación del contenido de lactato y de acetil-CoA: control, FXa y FXa+rivaroxabán.

COMPUESTO	CONTROL	FACTOR XA	FACTOR XA + RIVAROXABÁN
Lactato (nmol/mg prot)	17.04 ± 1.42	15.92 ± 2.31	18.52±2.89
Acetil CoA (pmol/mg prot)	2.02 ± 0.39	5,20 ± 0,67*	1.39 ± 0.28 [#]

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * p<0.05 con respecto al control.

[#] p<0.05 con respecto a FXa solo.

5.3.2. Efectos en la expresión de proteínas relacionadas con la betaoxidación de ácidos grasos.

El nivel de expresión de las proteínas CPT-I y CPT-II fue significativamente mayor en las arterias incubadas con FXa + rivaroxabán en comparación tanto con FXa solo como con las arterias de control (figuras 1A y 1B).

Al respecto de las isoformas de los precursores mitocondriales de acil-CoA deshidrogenasa, ninguna de ellas fue modificada por rivaroxabán (Tabla 5.14).

Tabla 5.14. Niveles de expresión de precursores mitocondriales de acil-CoA deshidrogenasa: control, FXa y FXa+rivaroxabán.

PM DE ACIL-CoA DH	FACTOR Xa + RIVAROXABÁN		
	CONTROL (AU)	FACTOR Xa (AU)	(AU)
Isoforma 1	6.40±1.91	9.79±3.54	5.79±1.46
Isoforma 2	5.22±1.46	5.39±1.42	4.54±0.84

PM: precursor mitocondrial. DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE.

* p<0.05 con respecto al control. # p<0.05 con respecto a FXa solo. No estadísticamente significativo en este caso.

5.3.3. Efectos en la actividad aconitasa: ciclo de Krebs.

Además, la actividad de la aconitasa se incrementó en las arterias incubadas con FXa + rivaroxabán con respecto a las incubadas con solo FXa (Fig. 5.3).

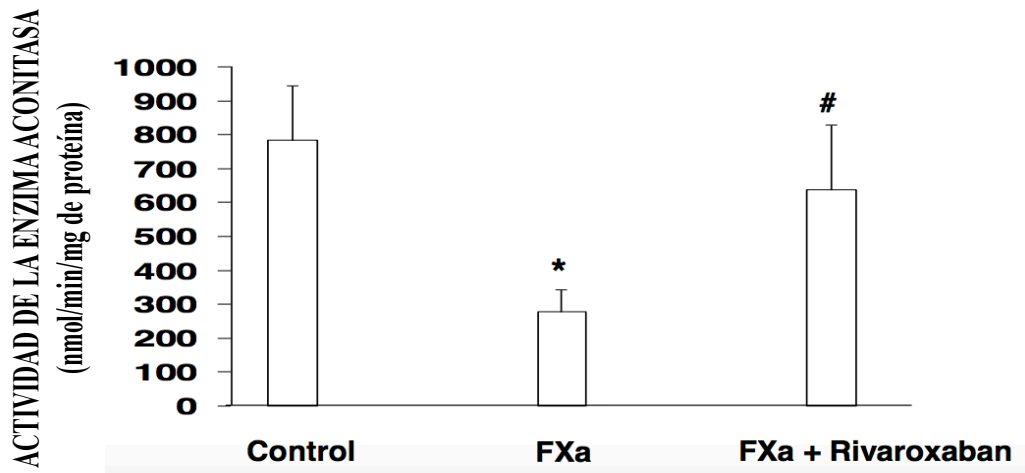


Figura 5.3. Los gráficos de barras muestran la actividad de la aconitasa en las arterias femorales de pacientes diabéticos, incubadas en presencia y ausencia de FXa y rivaroxabán. Los resultados se representan como media ± DE. * P <0,05 con respecto al control.

p<0.05 con respecto a FXa solo.

5.3.4. Efectos en la expresión de proteínas relacionadas con la vía de la creatina kinasa.

Por último, la expresión de cadena M de creatina quinasa se redujo en las arterias femorales incubadas con FXa+rivaroxabán en comparación con las incubadas con FXa solo y era similar a la encontrada en las arterias de control (Tabla 5.15).

Tabla 5.15. Niveles de expresión de la subunidad M de la creatinin-kinasa: control, FXa y FXa+rivaroxabán.

PROTEÍNA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)	FACTOR XA +
			RIVAROXABÁN (AU)
Subunidad M de creatinin-kinasa	13.39±4.37	33.96±7.96*	15.16±3.45#

A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * p<0.05 con respecto al control.

p<0.05 con respecto a FXa solo.

5.4. EFECTOS DE FXA Y RIVAROXABÁN SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.

Se identificaron las siguientes proteínas:

- glutatión-S-transferasa.
- aldehído deshidrogenasa.
- subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa

Como muestra la tabla 5.16, FXa aumentó el nivel de expresión de la proteína glutatión-S-transferasa y dos isoformas de la aldehído deshidrogenasa en comparación con el control.

Tabla 5.16. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo.

PROTEÍNA	CONTROL (AU)	FACTOR XA (AU)	FACTOR XA + RIVAROXABÁN (AU)
Glutation-S- transferasa	56.44±11.57	98.09±8.06*	43.49±7.53#
Aldehído DH			
Isoforma 1	12.29±3.88	27.66±7.99*	15.42±3.33#
Isoforma 2	17.14±6.20	31.25±6.99*	15.24±4.02#

DH: deshidrogenasa. A.U.: Unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como media ± DE. * p<0.05 con respecto al control.

p<0.05 con respecto a FXa solo.

El nivel de expresión de la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa también fue significativamente mayor en las arterias femorales incubadas con FXa que en el control (Fig. 4).

La adición de rivaroxabán a FXa redujo el nivel de expresión tanto de glutatión-S-transferasa y como de dos isoformas de la aldehído deshidrogenasa (Tabla 5.16). Por otra parte, la presencia de rivaroxabán también redujo el aumento de la expresión de la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa observado en las arterias incubadas con solo FXa (Fig. 5.4).

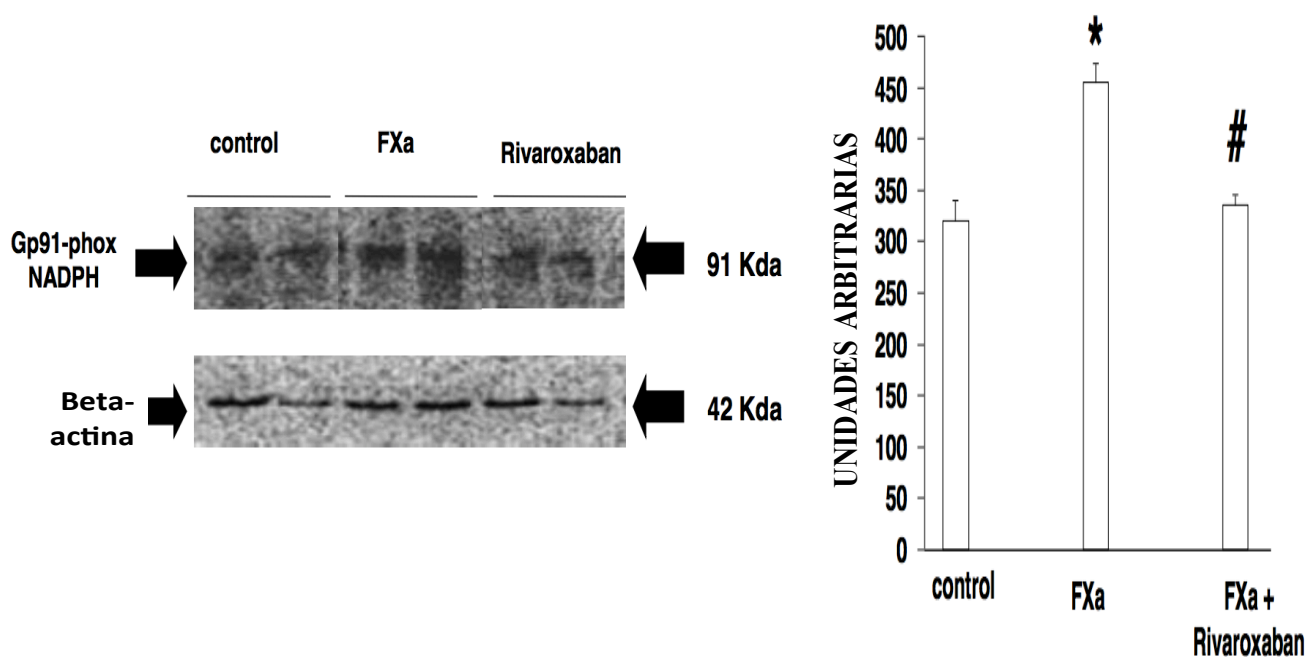


Fig. 5.4. Western blots representativos de NADPH gp91-phox. Los gráficos de barras muestran el análisis densitométrico en unidades arbitrarias (AU) de todos los Western blots. La expresión de β -actina se utilizó como control de carga de proteína. Los valores densitométricos se representan como media \pm DE.

* $P < 0,05$ con respecto al control. # $P < 0,05$ con respecto a solo FXa.

6

DISCUSIÓN

*“Daría todo lo que sé por la mitad de lo
que ignoro”
René Descartes*

6. DISCUSIÓN

Se cree que las anomalías en la producción de energía celular, ligadas al ya conocido estrés oxidativo, son la causa determinante de la aparición de complicaciones en los pacientes diabéticos, siendo el metabolismo de la glucosa, obviamente, uno de los factores clave de esta desregulación²³⁵. La hiperglucemia se constituye como una causa fundamental de la disfunción endotelial que conduce a la formación de la placa de ateroma a través de diversos mecanismos (entre otras causas como la propia resistencia a la insulina, y otras consecuencias como la nefropatía, la retinopatía, etc.). De hecho, en un estudio publicado por Hall et al²³⁶, se objetivó que la hiperglucemia inhibía la apoptosis de las células musculares lisas de la pared arterial, vía proteína kinasa C (PKC), postulando este hecho como causa fundamental de las complicaciones en pacientes diabéticos. Posteriormente, otros estudios implican también la activación de la PKC como mecanismo gatillo de la cascada de acontecimientos que desencadenan en la disfunción endotelial en la diabetes. Así por ejemplo, Inoguchi et al¹¹⁶ objetivaron que las altas concentraciones de glucosa intracelular conducían a la activación de la PKC y la subsiguiente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la NADPH oxidasa, conduciendo a una situación de estrés oxidativo. No obstante, existen estudios que señalan a los productos de glicación avanzada (AGEs) como moléculas responsables, independientes de la hiperglucemia, de las complicaciones de la diabetes. Así por ejemplo, Chinelli et al²³⁷ encontraron una elevada concentración tanto intra como extracelular de AGEs en pacientes diabéticos, que no se relacionaban con los niveles de glucemia que presentaban en sangre.

Es decir, que, en base a la literatura y según se expuso detalladamente en la introducción de la presente tesis, podríamos concluir que las complicaciones tanto macro, como micro vasculares que se producen en la diabetes obedecen a un complejo entramado de desregulaciones de la pared endotelial en la que participan un abundante número de factores tales como la hiperglucemia, la alteración del metabolismo celular que conduce a estrés oxidativo, la formación de AGEs, los microRNAs, etc..., existiendo una dependencia entre todos ellos que sigue siendo, aun hoy, objeto de estudio.

Con respecto al factor Xa, varios estudios han relacionado a un estado procoagulante tanto con la diabetes como con la generación de la placa de ateroma. Así por ejemplo, Dayer et al²³⁸ encontraron un aumento de factores de coagulación en sangre de pacientes diabéticos en relación con una muestra de pacientes sanos. Borissoff et al¹⁷³, objetivaron un aumento de diversos factores de la coagulación, entre ellos el factor Xa, en el interior de las placas de ateroma.

Por todo lo anteriormente mencionado, esta tesis intenta conocer más acerca del factor Xa en su papel como otro de los mecanismos responsables de la arterioesclerosis en pacientes diabéticos, ya que, cuanto mejor conocida sea esta enfermedad, mejor podremos tratarla.

6.1. EFECTOS DEL FACTOR Xa SOBRE EL METABOLISMO CELULAR

Con respecto a los efectos del FXa sobre el metabolismo celular, el presente estudio muestra por primera vez los efectos de FXa en el metabolismo energético en arterias humanas.

En la glucolisis, podríamos sugerir que FXa estimuló la vía glucolítica en las arterias de diabéticos, ya que aumentó el nivel de expresión de dos enzimas clave de la glucolisis: triosafosfato isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Esto podría deberse a que, en la pared arterial, la estimulación de diferentes mecanismos moleculares provocados por FXa, es decir, la proliferación celular y la síntesis de mediadores inflamatorios, puede requerir un aumento de la demanda de energía que estimulara la vía glucolítica. De hecho, no son pocos los estudios que relacionan al factor Xa con un aumento de la proliferación celular, la fibrosis y la inflamación. Así, Bono et al²³⁹ mostraron cómo las células endoteliales de vena umbilical expresaban un gran número de receptores de proteasa endotelial (EPR-1) en relación con un aumento de la mitogénesis y la proliferación celular inducido por FXa. Así mismo, Busch et al¹⁹⁸ encontraron un aumento de FXa y de interleuquina-8 (IL-8) en pacientes con infarto agudo de miocardio con respecto al grupo control de pacientes que sólo presentaron angor; in vitro, establecieron una asociación entre FXa y la producción de esta molécula inflamatoria a través de receptores de proteasa (PAR).

No obstante, en nuestro estudio, el aumento de las enzimas de la vía glucolítica no se acompañó de un aumento de la expresión de la piruvato deshidrogenasa (una

enzima incluida en el complejo piruvato deshidrogenasa que media la oxidación del piruvato para producir acetil-CoA) que, de hecho, se redujo en las arterias incubadas con FXa. Esta disminución de la expresión de piruvato deshidrogenasa podría sugerir un aumento de la glucólisis anaerobia, en la que el piruvato se transforma en lactato. No obstante, en nuestro estudio, en los cultivos con FXa no se objetivó un aumento significativo del contenido de lactato ni de lactato deshidrogenasa. Esto podría deberse a un consumo aumentado del lactato que impidiera su acúmulo, bien por una desviación del mismo hacia el ciclo de Cori (en el que el lactato se transporta al hígado para transformarse allí en piruvato y, posteriormente, en glucosa); o bien por seguir otra ruta anabólica, la gluconeogénesis, que, además, emplea las 2 enzimas mencionadas previamente en la glucólisis (la triosa fosfato isomerasa y la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), solo que en sentido contrario. De hecho, en los pacientes diabéticos, la gluconeogénesis y el ciclo de Cori son una de las fuentes principales en la producción de glucosa, incluso por encima de la glucólisis^{240,241}.

Así mismo, dado que la piruvato deshidrogenasa se expresa menos por FXa, otro hallazgo paradójico fue el aumento del contenido de acetil-CoA en las arterias incubadas con FXa. Esto podría deberse a que la beta oxidación de ácidos grasos de cadena larga es una vía metabólica alternativa a la oxidación de glucosa, y también produce acetil-CoA. De hecho, se han reportado niveles elevados de ácidos grasos libres circulantes en los pacientes diabéticos, debido a su exceso de liberación por el tejido adiposo y a la absorción disminuida por el músculo esquelético. Así, Boden et al²⁴² objetivaron un aumento de ácidos grasos libres en pacientes diabéticos, señalando el aumento de éstos como uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, tanto por producir una inhibición de los efectos de la insulina, como por

disminuir la producción endógena de glucosa. Por otro lado, Kelley et al²⁴³ mostraron una deficiente captación de ácidos grasos libres por parte del músculo esquelético en pacientes diabéticos.

En base a lo anteriormente mencionado, podríamos sugerir un aumento del metabolismo de ácidos grasos intracelular; sin embargo, el nivel de expresión de ninguno de los dos limitantes de la velocidad de las enzimas de oxidación de ácidos grasos de cadena larga, CPTI y CPTII (que participan en el transporte mitocondrial de ácidos grasos), ni dos isotipos de los precursores mitocondriales de acil-CoA deshidrogenasa (enzima implicada en la betaoxidación de ácidos grasos) fueron modificados por FXa. Tomados en conjunto, estos hallazgos parecen sugerir una disminución de la participación de la beta oxidación de ácidos grasos de cadena larga como fuente alternativa para aumentar la acetil-CoA en las arterias incubadas con FXa.

Otra posible causa para aumentar la acumulación de acetil-CoA por FXa en las arterias femorales de diabéticos podría ser la interrupción del metabolismo de energía aguas abajo de acetil-CoA (ésta es metabolizada a través del ciclo del ácido tricarboxílico en las mitocondrias). Se ha documentado una reducción del ciclo del ácido tricarboxílico en pacientes diabéticos tipo 2^{244,245} y, en el presente estudio, la actividad aconitasa (enzima que convierte el citrato a isocitrato en el ciclo del ácido tricarboxílico) se redujo significativamente en las arterias femorales incubadas con FXa, por lo que éste podría contribuir a la mencionada disminución del ciclo de Krebs ya observada en la diabetes.

Además de las vías mencionadas previamente, existe otra fuente productora de

ATP en la célula, el sistema de la ATP-fosfocreatina, también llamado glucólisis anaerobia aláctica. Ésta mantiene elevados los niveles de ATP cuando otras fuentes de generación de ATP no son capaces de soportar los requerimientos energía²⁴⁶. En las arterias incubadas con FXa se objetivó un aumento de la expresión de la cadena M de la creatina quinasa. Esto podría deberse, según los hallazgos mencionados previamente, a que las arterias incubadas con FXa, probablemente, pueden sufrir una reducción del metabolismo mitocondrial, por lo que se necesitarían fuentes alternativas para proporcionar ATP en la pared vascular.

Estos hallazgos son importantes, ya que varios estudios han reportado que las anomalías mitocondriales pueden ser las primeras manifestaciones de la diabetes, siendo la pérdida definitiva de la generación de ATP la que conlleva la muerte celular en las últimas etapas de progresión de la enfermedad, por lo que el FXa contribuiría a esta progresión según nuestros hallazgos^{247,248}.

Resumiendo, FXa parece contribuir a agravar los daños sobre el metabolismo celular ya presentes en la diabetes, disminuyendo el metabolismo mitocondrial (el metabolismo de ácidos grasos y el ciclo de Krebs), a la vez que aumenta la vía glucolítica.

6.2. EFECTOS DEL FACTOR XA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Como se explicó previamente, las complicaciones tanto macro como microvasculares que se producen en la diabetes obedecen a un complejo entramado de

desregulaciones de la pared endotelial en la que, con cada vez más evidencia científica, podemos señalar al estrés oxidativo como un pilar fundamental. Dentro del amplio número de estudios publicados a lo largo de los años, destacamos a Magenta et al²⁴⁹ que describen cómo el estrés oxidativo, a través de la modulación de la vía de p66shc-NO, incide en muchos aspectos cruciales de la disfunción endotelial diabética. Por otro lado, Paneni et al¹¹⁵ relatan el papel tan importante que juega el estrés oxidativo en el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares, postulando que la acumulación de radicales libres en la vasculatura de los pacientes diabéticos es responsable de la activación de las vías bioquímicas dañinas, la desregulación de miRs, la liberación de micropartículas y los cambios epigenéticos que contribuyen a la inflamación vascular y la generación de ROS. Chang et al²⁵⁰ relacionan el estrés oxidativo no sólo con las complicaciones de la diabetes, sino también con la propia etiología de la misma. Niedowicz et al²⁵¹ describieron parte de los mecanismos fisiopatológicos por los que el estrés oxidativo produce las complicaciones observadas en pacientes diabéticos, siendo los lípidos, el ADN y las proteínas las dianas celulares de la oxidación, conduciendo a cambios en la estructura y en la función celular. Nowontny et al²⁵² responsabilizan a los productos de glicación avanzada en la fisiopatología de la diabetes y sus complicaciones, siendo éstos tanto causa como consecuencia de un estado oxidativo. Por último, Maiese et al²⁵³ recogen recientemente la última evidencia que señala a tres proteínas que intervienen en las vías de señal intra e intercelulares, mTOR, SIRT1 y Wnt como objetivos de tratamiento para la diabetes mellitus, ya que estas vías podrían explicar la compleja relación entre el estrés oxidativo, las células madre, los factores de crecimiento, la intolerancia a la glucosa, las vías de apoptosis y la autofagia, la remodelación tisular, la homeostasis de la energía celular y la biología vascular que afectan en gran medida la progresión de la diabetes

mellitus.

Como se ha mencionado previamente, sabemos que el estrés oxidativo se encuentra estrechamente relacionado con un gran número de procesos patológicos, entre ellos una alteración de la coagulación²⁵⁴ y también sabemos que el FXa es capaz de intervenir en la inflamación y remodelación de tejidos vía receptor de proteasa (PAR)^{171,172,255,256,257} (de hecho, la interacción bidireccional entre la coagulación y la inflamación es bien conocida y los PAR forman la conexión molecular entre ambas^{171,258} habiéndose identificado cuatro PAR (PAR-1-4) en humanos, expresándose en las membranas de las plaquetas y varios tipos de células, incluyendo las células endoteliales, los leucocitos y las células musculares lisas²⁵⁹; FXa actuaría, sobre todo, sobre PAR-1 y PAR-2)²⁵⁵.

No obstante, menos demostrada es la relación entre FXa con el estrés oxidativo, y menos aún en la pared vascular. Jobi et al constataron un aumento del estrés oxidativo producido por FXa en vena safena humana vía PAR-2²⁶⁰; por otro lado, Caliskan et al objetivaron una disminución del estrés oxidativo postisquemia en arterias de rata tratadas con inhibidores de Xa²⁶¹.

En el presente estudio, FXa aumentó el nivel de expresión de la subunidad catalítica gp91-phox de la NADPH oxidasa, que es la principal fuente de ROS en la adventicia vascular^{262,263,264,265}. Estos hallazgos concuerdan con el estudio mencionado previamente de Jobi et al, en el que el aumento del estrés oxidativo se producía a expensas de una aumento de la NADPH oxidasa.

Por otro lado, FXa también indujo un aumento de la expresión de dos isoformas aldehído deshidrogenasa citosólica. Ésta, además de oxidar aldehídos a ácidos carboxílicos y actuar como un antioxidante, cataliza la formación de dinitrato de 1,2-glicerol a nitrito de nitroglicerina, la cual lidera la vasorrelajación dependiente de guanilato monofosfato cíclico (cGMP). El aumento de la expresión de esta enzima inducido por FXa resulta interesante, ya que concuerda con el resultado de varios estudios en modelos animales en los que el FXa estaría implicado en la inflamación y la hipotensión inducida por óxido nítrico (el cual media la relajación vascular relacionada con el cGMP)^{169,170,266}.

En el presente trabajo se observó también un aumento de la expresión de la glutatión-S-transferasa, una proteína antioxidante²⁶⁷. El cociente entre el glutatión reducido y oxidado dentro de las células se utiliza a menudo como indicador del estado oxidativo de la célula y de la toxicidad celular²⁶⁸. Por lo tanto, podríamos sugerir que FXa puede exacerbar el estrés oxidativo en la pared vascular de los pacientes diabéticos, que puede contribuir a la disfunción arterial.

Bajo una visión global, en base a todo lo anteriormente mencionado, así como por los hallazgos de otros autores ampliamente descritos en la literatura, podríamos decir que la función del factor Xa no se limita a su acción sobre la cascada de la coagulación, sino que presenta multitud de efectos a otros niveles (sobre todo a través de la activación de receptores PAR). Los más importantes constatados en la presente tesis son la disfunción mitocondrial y el aumento de enzimas de la glucólisis y del estrés oxidativo, que, sólo de alguna manera, se podrían relacionar con el llamado efecto

Warburg. Este efecto fue descrito inicialmente en células tumorales y consiste en que, cuando hay glucosa suficiente y/o la célula está proliferando, se utiliza preferentemente la vía glucolítica (conversión de glucosa a lactato) para generar ATP, incluso en condiciones de normoxia, inhibiéndose la entrada del piruvato a la mitocondria²⁶⁹. Numerosos estudios han mostrado que en pacientes con disfunción metabólica y/o diabetes el organismo se encuentra sometido de forma global al efecto Warburg, con un aumento generalizado del metabolismo glicolítico y una supresión de la actividad oxidativa mitocondrial²⁷⁰. También se ha observado que esta situación se asocia a un aumento, aparentemente paradójico, en la producción mitocondrial de ROS y a la aparición de situaciones de estrés oxidativo. Hasta hace poco se desconocía el mecanismo que vinculaba al efecto Warburg con el estrés oxidativo, pero varios trabajos^{271,272} han servido para proponer que la excesiva producción de ROS asociada a la disfunción metabólica se debe a que los mecanismos de detoxificación y protección frente a ROS se encuentran suprimidos cuando la actividad metabólica mitocondrial esta inhibida. Se ha propuesto que este fenómeno también tiene lugar en las primeras fases de la disfunción endotelial²⁷³, y que podría estar causado por un defecto en la respiración mitocondrial, lo que disminuiría la eficacia en la generación de ATP por el proceso de la fosforilación oxidativa y supondría un aumento en el número de electrones que se escapan de la cadena de transporte de electrones para reaccionar con el oxígeno molecular, generando ROS.

Por lo tanto, podríamos sugerir la existencia de mecanismos moleculares alternativos a los descritos en el efecto Warburg en pacientes diabéticos por acción de FXa: vemos un aumento de la vía glucolítica y del estrés oxidativo, pero no observamos niveles aumentados de lactato y sí un aumento de la NADPH oxidasa (no

simplemente una disminución de los mecanismos de defensa frente a ROS).

6.3 EFECTOS DE RIVAROXABÁN SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR FXA

El contenido de acetil-CoA se redujo en las arterias incubadas con rivaroxabán y FXa, lo que sugiere que la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico probablemente fue restaurada por rivaroxabán. Además, el hecho de que la actividad aconitasa también fuera restaurada por Rivaroxaban respalda esta idea. Tomados en conjunto, la disminución de acetil-CoA, el aumento de la actividad de la aconitasa, y el mayor nivel de expresión de los dos transportadores de ácidos grasos mitocondriales, CPT-I y CPT-II, apoyan un aumento del metabolismo energético mitocondrial por rivaroxabán.

En las arterias femorales arterioescleróticas de diabéticos, rivaroxabán también impidió la sobreexpresión de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo inducido por FXa. Esto también concuerda con la mejora aparente de la funcionalidad mitocondrial con rivaroxabán.

No obstante, aunque impidió la mayor parte de los efectos de FXa en el metabolismo de la glucosa también, no pudo modificar la disminución de la expresión de piruvato deshidrogenasa inducida por FXa. Este hecho parece difícil de explicar, dado que el rivaroxabán inhibe específicamente la actividad de FXa. Sin embargo, Bono F et al¹⁷⁶ previamente observaron que la inhibición de Xa mediante su inactivación catalítica inhibía los efectos de FXa (medidos mediante el aumento de calcio libre citosólico inducido por FXa) vía PAR, pero no consiguieron inhibir la unión de FXa al receptor de células efectoras de la proteasa-1 (EPR-1). EPR-1 actúa como cofactor para

FXa para catalizar la activación de la protrombina y su expresión fue reportada en células endoteliales^{239,274}. Por lo tanto, se necesitarían más estudios para caracterizar si en las arterias femorales arterioescleróticas de diabéticos EPR-1 está acoplado a una vía de señalización celular diferente a los PAR, que pudiera explicar esta disminución de la expresión de piruvato deshidrogenasa inducida por FXa.

6.4. COMENTARIOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una observación extraída de los presentes hallazgos fue que rivaroxabán podría ejercer efectos adicionales no relacionados con FXa, dado que FXa por sí mismo no modifica la expresión de CPT-I y CPT-II en las arterias femorales de diabéticos pero ésta sí se incrementó en presencia de rivaroxabán; así mismo, rivaroxabán fue capaz de disminuir la expresión de piruvato deshidrogenasa de forma significativa con respecto a FXa. En este sentido, Weinz et al¹⁹² describieron la existencia de metabolitos derivados de rivaroxabán in vivo, por lo que, a pesar de considerarse inactivos en cuanto a su función sobre el FXa, no podemos descartar que el efecto observado de rivaroxabán en la expresión CPT-I, CPT-II y piruvato deshidrogenasa pueda ser debido a rivaroxabán por sí mismo, sino también por algunos de sus metabolitos. Sin embargo, está fuera del alcance del presente estudio y se necesitan experimentos adicionales para dilucidarlo.

Una limitación del presente estudio es la dificultad para determinar las implicaciones clínicas de los efectos de FXa en el metabolismo energético y el estrés oxidativo en las arterias femorales arterioescleróticas de diabéticos. Numerosos estudios han objetivado efectos beneficiosos del rivaroxabán más allá de su efecto como fármaco anticoagulante. Así, Zhou et al²⁷⁵ publicaron sus hallazgos en modelos animales tras la

administración de rivaroxabán, objetivando una estabilización de la placa de ateroma y una disminución de la expresión de moléculas proinflamatorias; no obstante, no pudieron establecer una disminución en la progresión de la placa. Por el contrario, Hara et al²⁷⁶ han publicado recientemente un estudio también en modelos animales en el que sí observaron una disminución de la progresión de la placa, así como la estabilización de la misma, basando estos hallazgos en la inhibición también del efecto proinflamatorio que el FXa produce, sobre todo, en macrófagos. Por otro lado Wu et al²⁷⁷ objetivaron cómo rivaroxabán promovió la neovascularización en miembros isquémicos de ratones diabéticos, asociando estos efectos con aumento de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Caliskan et al²⁶¹, como se mencionó previamente, objetivaron cómo en rivaroxabán era capaz de inhibir la respuesta oxidativa tras la reperusión de extremidades isquémicas, también en modelos animales.

Pero todos estos estudios, al igual que el nuestro, precisan ser extrapolables a la práctica clínica diaria con pacientes. A este respecto, Gibson et al publicaron en 2013 los resultados del estudio ATLAS-ACS. En él fueron incluidos 15,526 pacientes tratados mediante stent tras un síndrome coronario agudo. Todos los pacientes recibían doble antiagregación, y a la mitad de ellos, de forma aleatorizada se les administraron 2 dosis diarias de rivaroxabán, frente al resto que recibieron placebo. En el grupo de rivaroxabán, se objetivó una reducción de la trombosis de stent y de la mortalidad con respecto al grupo placebo²⁷⁸. Así mismo, actualmente se está llevando a cabo el estudio COMMANDER HF, en el que se evalúa la mortalidad, la presencia de infarto agudo de miocardio o el accidente isquémico cerebral en pacientes con fallo cardíaco y enfermedad coronaria tratados de forma aleatoria y doble ciego con placebo o

rivaroxabán, cuyos resultados aún están por venir y serán de suma importancia en el futuro para la práctica clínica diaria²⁷⁹.

Por lo tanto, el hecho de que FXa pueda ejercer efectos vasculares además de participar en la coagulación debería aumentar el interés por las perspectivas farmacológicas de los inhibidores de FXa. En este sentido, es plausible la incorporación de inhibidores específicos de FXa como rivaroxabán al tratamiento de los pacientes de alto riesgo cardiovascular, como pacientes diabéticos tipo 2, ya que puede mejorar la prevención de eventos vasculares agudos, donde la funcionalidad vascular juega un papel fundamental.

7

CONCLUSIONES

*“Un comienzo no desaparece
nunca, ni siquiera con un final”
Harry Mulisch*

7. CONCLUSIONES

1.- La incubación de segmentos de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos con el factor de coagulación Xa produce un aumento significativo de la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo glucolítico, que son la triosafofato isomerasa y la isoforma 1 de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, lo que sugeriría un aumento de la glucolisis.

2.- En los segmentos incubados de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos, el factor Xa no produce modificaciones en la actividad de la beta-oxidación de ácidos grasos, mientras que sí parece producir una disminución en el ciclo de Krebs.

3.- La incubación de segmentos de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos con el factor Xa produce un aumento significativo de la vía de la creatina quinasa, que es una vía alternativa de obtención de energía, fundamentalmente cuando es complicado utilizar otras vías metabólicas.

4.- El factor Xa produce un aumento de la expresión de la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa, la glutatión S-transferasa y la aldehído deshidrogenasa en segmentos de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos. El aumento en la expresión de estas últimas dos enzimas podrían ocurrir como respuesta compensadora a un posible aumento de la formación de radicales libres por la presencia de factor Xa, probablemente en relación con la NADPH oxidasa.

5.- El Rivaroxabán previene todos estos efectos producidos por el factor Xa y, además, produce un aumento por sí mismo de la carnitina palmitoiltransferasa I y II, lo que facilitaría la incorporación de los ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria facilitando su metabolismo, lo que podría suponer un efecto beneficioso adicional para la pared arterial de pacientes diabéticos con arterioesclerosis.

6.- En conjunto, los datos presentados en esta Tesis Doctoral muestran que el factor Xa presenta una funcionalidad que probablemente no se circunscriba exclusivamente a su papel en la cascada de la coagulación.

8

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Clark JM, Glagov S. *Luminal surface of distended arteries by scanning electron microscopy: eliminating configurational and technical artefacts*. Br J Exp Pathol 1976;57:129-35.
- 2.- Levy B, Tedgui A (ed). *Biology of the arterial Wall*. Norwell, MA: Kluwer Academic; 1999.
- 3.- Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. *Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo*. Biophys J 2003;85:637-45.
- 4.- Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA. *Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells*. J Cell Biol 1984;99:692-98.
- 5.- Wight TN. *Cell biology of arterial proteoglycans*. Arteriosclerosis 1989;9:1-20.
- 6.- Sidawy A, Sumpio B, DePalma R (ed). *The basic science of vascular disease*. Armonk, NY: Futura; 1997.
- 7.- Dobrin PB. *Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media*. Hypertension 1999;33:806-10.
- 8.- Parra-Bonilla G, Alvarez DF, Al-Mehdi AB, Alexeyev M, Stevens T. *Critical role for lactate dehydrogenase A in aerobic glycolysis that sustains pulmonary microvascular endothelial cell proliferation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2010;299:513-522.
- 9.- De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. *Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting*. Cell Metab 2013;18:634-647.
- 10.- De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquiere B, Cauwenberghs S, Eelen G et al. *Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting*. Cell 2013;154:651-663.

- 11.- Nelson D, Cox M (ed). *Principles of Biochemistry. Glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway*. Lehninger. W.H.Freeman; 2004.
- 12.- Christopher K. Mathews, K. E. Van Holde. Bioquímica. En: Cistopher K. Mathews, K. E. Van Holde/ JM González de Buitrago. Bioquímica. Segunda edición. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2001. ISBN 84-486-0213-7.
- 13.- Thomas M. Devlin. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Primera edición. En: Thomas M. Devlin/ Francesc Canals. Barcelona: Editorial Reverte S.A, 2004. ISBN 8429172084, 9788429172089.
- 14.- Donald Voet, Judith G. Voet. Bioquímica. En: Donald Voet, Judith G. Voet/ Pablo Baldi. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006. ISBN 950-06-2301-3.
- 15.- Lowenstein JM (1969). *Methods in Enzymology, Volume 13: Citric Acid Cycle*. Boston: Academic Press. ISBN 0-12-181870-5.
- 16.- Krebs HA, Weitzman PDJ (1987). *Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning*. London: Biochemical Society. ISBN 0-904498-22-0.
- 17.- Schultz B, Chan S. *Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzyme*. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2001;30:23-65.
- 18.- Capaldi R, Aggeler R. *Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor*. Trends Biochem Sci 2002;27 (3):154-60.
- 19.- Dimroth P, von Ballmoos C, Meier T. *Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. EMBO Rep* 2006;7(3):276-82.
- 20.- Ford M. A., T. G. Allison y A. Lerman. *New Approaches to the Concept of Primary Prevention of Atherosclerosis*. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2008 Feb;10(1):73-82.
- 21.- Vincent, H. K.; K. E. Innes y K. R. Vincent. *Oxidative Stress and Potential*

Interventions to Reduce Oxidative Stress in Overweight and Obesity. Diabetes Obes Metab. 2007 Nov;9(6):813-39.

22.- Zalba G, González A, Beaumont J, San José G, Moreno U, López B, Ravassa S, Muñiz P, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J. *Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction.* Nefrologia. 2001;21 Suppl 1:61-6.

23.- Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. *Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants.* Eur J Clin Invest. 2004 Sep;34(9):619-25.

24.- Jiménez-Rosales A1, Amaya-Chávez A, Domínguez García MV, Camarillo-Romero E, Huitrón Bravo GG, Cruz AM. *Association of inflammatory and oxidative stress biomarkers in subjects with cardiovascular risk.* Am J Ther. 2013 Jul-Aug;20(4):422-31.

25.- Reddy Thavanati PK, Kanala KR, de Dios AE, Cantu Garza JM. *Age-Related Correlation Between Antioxidant Enzymes and DNA damage with smoking and body mass index.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008 Apr;63(4):360-4.

26.- Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. *Endothelium and atherosclerosis.* J Hypertens Suppl 1992;10:S43-50.

27.- Badimón L, Martínez-González J. *Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos.* Rev Esp Cardiol 2002;55:S17-26.

28.- Badimón L. *Estatinas y función endotelial.* Rev Esp Cardiol 2003;3:C25-40.

29.- Weseler, A.R. and Bast, A. *Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments.* Curr. Hypertens. Rep. 2010; 12: 154–161.

30.- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor.* Am J Physiol 1986;250:H822-7.

- 31.- Beckman JS, Koppenol WH. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol 1996;271:C1424-37.
- 32.- Badimón L, Martínez-González J. *Disfunción endotelial*. Rev Esp Cardiol 2006;6:21-30.
- 33.- Nordestgaard B, Nielsen L. *Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins*. Curr Opin Lipidol 1994;5:252-7.
- 34.- Zhao B, Ehringer WD, Dierichs R, Miller FN. *Oxidized low-density lipoprotein increases endothelial intracellular calcium and alters cytoskeletal f-actin distribution*. Eur J Clin Invest 1997;27:48-54.
- 35.- O. Jung MD, JG Schreiber, H Geiger, T Pedrazzini, R Busse, RP Brandes. *gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension*. Circulation. 2004;109:1795-1801.
- 36.- Zalba G, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. *NADPH oxidase-dependent superoxide production is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical atherosclerotic disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jul;25(7):1452-7.
- 37.- González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. *Essential hypertension and oxidative stress: New insights*. World J Cardiol. 2014 Jun 26;6(6):353-66.
- 38.- Glantzounis, G.K., Tsimoyiannis, E.C., Kappas, A.M., and Galaris, D.A. *Uric acid and oxidative stress*. Curr. Pharm. Des. 2005; 11: 4145–4151.
- 39.- Della Corte E, Stirpe F. *The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme*. Biochem. J. 1972; 126: 739–745.
- 40.- Cantu-Medellin, N. and Kelley, E.E. *Redox*. Biol. 2013; 1: 353–358.

- 41.- Battelli MG, Polito L, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: not only oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):562-7.
- 42.- Esplugues, J. V. y M. d. Barrachina (2004). Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas, en Florez, J. *Farmacología Humana*. 4a Ed., Barcelona, Masson.
- 43.- Zalba G, Fortuño A, San José G, Moreno MU, Beloqui O, Díez J. *Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease*. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24 Suppl 1:24-9.
- 44.- Voet Donald y Judith; *Bioquímica*; editorial Omega; Barcelona 1992;pp 704-711.
- 45.- Lehninger, Albert L; *Bioquímica*; Ed. Omega, Barcelona; pp 306-307,682,689.
- 46.- Nagababu E, Rifkind JM. *Heme degradation by reactive oxygen species*. *Antioxid Redox Signal*. 2004 Dec;6(6):967-78.
- 47.- Hayden MR1, Tyagi SC. *Intimal redox stress: accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus*. *Atheroscleropathy*. *Cardiovasc Diabetol*. 2002 Sep 27;1:3.
- 48.- Toyokuni S1, Akatsuka S. *Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era*. *Pathol Int*. 2007 Aug;57(8):461-73.
- 49.- Karihtala P, Soini Y. *Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies*. *APMIS*. 2007 Feb;115(2):81-103.
- 50.- Fukai T, Ushio-Fukai M. *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606.
- 51.- Rhee S, Chae H, Kim K. *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(12):1543-52.

- 52.-** Biteau B, Labarre J, Toledano MB. *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin*. Nature. 2003;425(6961):980-4.
- 53.-** Armstrong RN. *Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function*. Chem Res Toxicol. 1991;4:131–140.
- 54.-** Mannervik B., Danielson U. H. *Glutathione transferases. Structure and catalytic activity*. CRC Crit. Rev. Biochem. 1988; 23:283-337.
- 55.-** Wilce, M.C & Parker, M.W. *Structure and function of glutathione S-transferases*. Biochim. Biophys. 1994;Acta., 1- 18.
- 56.-** Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. *Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008;4:697–720.
- 57.-** Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. *Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart*. Science. 2008;321:1493–1495.
- 58.-** Doser TA, Turdi S, Thomas DP, Epstein PN, Li SY, Ren J. *Transgenic overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 rescues chronic alcohol intake-induced myocardial hypertrophy and contractile dysfunction*. Circulation. 2009;11:1941–1949.
- 59.-** Perlman DH, Bauer SM, Ashrafian H, Bryan NS, Garcia-Saura MF, Lim CC, et al. *Mechanistic insights into nitrite-induced cardioprotection using an integrated metabolomic/proteomic approach*. Circ Res. 2009;104:796–804.
- 60.-** Mazur A. *An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates*. J Biol Chem 1946;164:271-289.
- 61.-** Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, et al. *Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins*. Curr Opin Lipidol 1996;7:69-76.

- 62.-** Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, et al. *Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism.* Annu Rev Med 2003;54:371-392.
- 63.-** Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. *Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein.* FEBS Lett 1991;286:152-154.
- 64.-** Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. *Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis.* Circulation 1991;83:391-401.
- 65.-** Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. *Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase.* J Biol Chem 1995;270:319-24.
- 66.-** Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Badimon L. *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation.* Arterioscler Thromb Vascular Biol 2001;21:804-9.
- 67.-** Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. *Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase.* J Clin Invest 1999;103:897-905.
- 68.-** Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. *Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis.* Circulation 1998;97:2494-8.
- 69.-** Farmer JA, Torre-Amione G. *Atherosclerosis and inflammation.* Curr Atheroscler Rep 2002;4:92-8.
- 70.-** Collins T. *Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion.* Lab Invest 1993;68:499-508.

- 71.- Hajjar DP, Haberland ME. *Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs*. J Biol Chem 1997;272:22975-8.
- 72.- Collins T, Cybulsky MI. *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* J Clin Invest 2001;107:255-64.
- 73.- Thanos D, Maniatis T. *NF-kB: a lesson in family values*. Cell 1995;80:529-32.
- 74.- Bourcier T, Sukhova G, Libby P. *The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis*. J Biol Chem 1997;272:15817-24.
- 75.- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA et al. *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest 1995;96:60-8.
- 76.- Badimón L, Martínez-González J. *Bases moleculares y genéticas de las cardiopatías*. Bayés de Luna A, López Sendon JL, Attie F, Alegría Ezquerra E, editores. Cardiología clínica. Barcelona: Editorial Masson, S.A.;22003.p.30-44.
- 77.- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science 1991;251:788-91.
- 78.- Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD et al. *Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression*. Circ Res 1997;80:810-8.
- 79.- Libby P. *Inflammation in atherosclerosis*. Nature 2002;420:868-74.
- 80.- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P et al. *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell 1998;2:275-81.

- 81.-** Gordon S. *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell 2002;111:927-30.
- 82.-** Andersen HO, Holm P, Stender S, Hansen BF, Nordestgaard BG. *Dose-dependent suppression of transplant arteriosclerosis in aorta-allografted, cholesterol-clamped rabbits. Suppression not eliminated by the cholesterol-raising effect of cyclosporine*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:2515-23.
- 83.-** Steinberg D, Witztum JL. *Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?* Circulation 2002;105:2107-11.
- 84.-** Hansson GK. *Immune mechanisms in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1876-90.
- 85.-** Rambaldi A, Young DC, Griffin JD. *Expression of the M-CSF (CSF-1) gene by human monocytes*. Blood 1987;69:1409-13.
- 86.-** Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins*. Nature 1990;344:254-7.
- 87.-** Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D. *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans*. Am J Pathol 1992;140:291-300.
- 88.-** Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis*. Am J Pathol 1992;140:301-16.
- 89.-** Libby P, Ridker PM, Maseri A. *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation 2002;105:1135-43.
- 90.-** Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW et al.

Atherosclerotic vascular disease conference: Writing group III: pathophysiology. Circulation 2004;109:2617-25.

91.- Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. *The good smooth muscle cells in atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep 2000;2:422-9.

92.- Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. *Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death.* Circulation 1989;80:1747-56.

93.- Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts).* N Engl J Med 1976;295:369-77.

94.- Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts).* N Engl J Med 1976;295:420-5.

95.- Tedgui A, Mallat Z. *Apoptosis as a determinant of atherothrombosis.* Thromb Haemost 2001;86:420-6.

96.- Hoffmann U, Brady TJ, Muller J. *Cardiology patient page. Use of new imaging techniques to screen for coronary artery disease.* Circulation 2003;108:e50-3.

97.- Demer LL, Tintut Y. *Osteopontin. Between a rock and a hard plaque.* Circ Res 1999;84:250-2.

98.- Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. *Osteopontin expression in cardiovascular diseases.* Ann N Y Acad Sci 1995;760:109-26.

99.- Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. *Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture.* Circulation 1994;90:775-8.

- 100.-** Kaartinen M, Penttilä M, Kovanen PT. *Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture.* Circulation 1994;90:1669-78.
- 101.-** Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. *Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression.* Circulation 1992;86:III1-11.
- 102.-** Badimon JJ, Zaman A, Helft G, Fayad Z, Fuster V. *Acute coronary syndromes: pathophysiology and preventive priorities.* Thromb Haemost 1999;82:997-1004.
- 103.-** González-Pacheco H. *From thrombin hypothesis to inflammation. Is it reality?* Arch Cardiol Mex 2006;76:S233-8.
- 104.-** Kockx MM. *Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18:1519-1522.
- 105.-** Mallat Z, Tedgui A. *Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease.* Circ Res 2001;88:998-1003.
- 106.-** Papanicolau DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. *The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease.* Ann Intern Med 1998;128:127-37.
- 107.-** International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 6th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2013.
- 108.-** International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Update Poster*, 6th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2014.
- 109.-** Morrish, N.; Wang, S.-L.; Stevens, L.; Fuller, J.; Keen, H. *Mortality and causes of death in the who multinational study of vascular disease in diabetes.* Diabetologia 2001, 44, S14–S21.
- 110.-** Beckman JA, Creager MA, Libby P. *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management.* JAMA. 2002;287:2570–2581.

- 111.-** Ceriello A, Motz E. *Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:816-23.
- 112.-** Giacco, F.; Brownlee, M. *Oxidative stress and diabetic complications.* Circ. Res. 2010, 107, 1058–1070.
- 113.-** Abdul-Ghani, M.A.; DeFronzo, R.A. *Oxidative stress in type 2 diabetes mellitus.* In *Oxidative stress in aging*, Miwa, S., Beckman, K., Muller, F., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2008; pp. 191–211.
- 114.-** Henriksen, E.J.; Diamond-Stanic, M.K.; Marchionne, E.M. *Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes.* Free Radic. Biol. Med. 2011, 51, 993–999.
- 115.-** Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I.* European Heart Journal. 2013;34(31):2436-2443.
- 116.-** Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells.* Diabetes 2000;49:1939 – 1945.
- 117.-** Cosentino F, Francia P, Camici GG, Pelicci PG, Luscher TF, Volpe M. *Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66shc protein.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:622 – 628.
- 118.-** Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Osto E, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. *Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66shc suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes.* Circ Res 2012;111:278 – 89.

- 119.-** Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. *High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells*. Circulation 1997;96:25 – 28.
- 120.-** Alp NJ, Channon KM. *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydro- biopterin in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:413-420.
- 121.-** Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. *Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the akt site*. J Clin Invest 2001;108:1341-1348.
- 122.-** Geraldès P, King GL. *Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications*. Circ Res 2010;106:1319 – 1331.
- 123.-** Kouroedov A, Eto M, Joch H, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. *Selective inhibition of protein kinase c β 2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells*. Circulation 2004;110: 91–96.
- 124.-** Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaïss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Münzel T. *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circ Res 2001;88:E14 – E22.
- 125.-** Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. *High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species*. Circulation 2003;107:1017 – 1023.

- 126.-** Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, Miyata T, Brownlee M, Stehouwer CD, De Mey JG, Schalkwijk CG. *Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress*. Diabetologia 2010;53:989 – 1000.
- 127.-** Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. *The rage axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature*. Circ Res 2010;106:842 – 853.
- 128.-** Fulop N, Marchase RB, Chatham JC. *Role of protein o-linked n-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res 2007;73:288 – 297.
- 129.-** Buse MG. *Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;290:E1 – E8.
- 130.-** Lee AY, Chung SS. *Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract*. FASEB J 1999;13:23 – 30.
- 131.-** Vikramadithyan RK, Hu Y, Noh HL, Liang CP, Hallam K, Tall AR, Ramasamy R, Goldberg IJ. *Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice*. J Clin Invest 2005;115:2434 – 2443.
- 132.-** Grant PJ. *Diabetes mellitus as a prothrombotic condition*. J Intern Med 2007;262:157-172.
- 133.-** Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C, Davi G. *Diabetes mellitus and thrombosis*. Thromb Res 2012;129:371–377.
- 134.-** Chaudhuri A, Janicke D, Wilson MF, Tripathy D, Garg R, Bandyopadhyay A, CalieriJ, Hoffmeyer D, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. *Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction*. Circulation 2004;109:849–854.

- 135.-** Myrup B, Rossing P, Jensen T, Gram J, Kluft C, Jespersen J. *Procoagulant activity and intimal dysfunction in IDDM*. Diabetologia. 1995 Jan;38(1):73-8.
- 136.-** Lupu C, Calb M, Ionescu M, Lupu F. *Enhanced prothrombin and intrinsic factor X activation on blood platelets from diabetic patients*. Thromb Haemost. 1993 Oct 18;70(4):579-83.
- 137.-** Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. *Platelet dysfunction in type 2 diabetes*. Diabetes Care. 2001;24(8):1476–85.
- 138.-** Capodanno D, Patel A, Dharmashankar K, Ferreira JL, Ueno M, Kodali M, et al. *Pharmacodynamic effects of different aspirin dosing regimens in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease*. Circ Cardiovasc Interv. 2011;4(2):180-7.
- 139.-** Lemkes BA, Hermanides J, Devries JH, Holleman F, Meijers JC, Hoekstra JB. *Hyperglycemia: a prothrombotic factor?* J Thromb Haemost 2010;8:1663–1669.
- 140.-** Boden G, Rao AK. *Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the tissue factor pathway of blood coagulation*. Curr Diab Rep 2007;7:223 – 227.
- 141.-** Kessler L, Wiesel ML, Attali P, Mossard JM, Cazenave JP, Pinget M. *Von Willebrand factor in diabetic angiopathy*. Diabetes Metab. 1998 Sep;24(4):327-36.
- 142.-** Eckel R. *Insulin Resistance: an adaptation for weight maintenance*. Lancet 1992; 340: 1452-3.
- 143.-** Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. *Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms*. Circulation 2006;113:1888 – 1904.

- 144.-** Kim JK. *Endothelial nuclear factor kappaB in obesity and aging: is endothelial nuclear factor kappaB a master regulator of inflammation and insulin resistance?* Circulation 2012;125:1081 – 1083.
- 145.-** Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. *Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOs activities by increasing endothelial fatty acid oxidation.* J Clin Invest 2006;116:1071 – 1080.
- 146.-** Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. *Role of micro RNAs in diabetes and its cardiovascular complications.* Cardiovasc Res 2012;93:583 – 593.
- 147.-** Zampetaki A , Mayr M. *MicroRNAs in vascular and metabolic disease.* CircRes2012; 110:508 – 522.
- 148.-** Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. *Plasma microrna profiling reveals loss of endothelial mir-126 and other microRNAs in type 2 diabetes.* Circ Res 2010;107:810–817.
- 149.-** Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. *MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus.* PLoS One 2011;6:e22839.
- 150.-** Dehwah MA, Xu A, Huang Q. *MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity.* J Genet Genomics 2012;39:11–18.
- 151.-** Wang XH, Qian RZ, Zhang W, Chen SF, Jin HM, Hu RM. *MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin- like growth factor-1 in type 2 diabetic rats.* Clin Exp Pharmacol Physiol 2009;36: 181 – 188.

- 152.-** Li Y, Song YH, Li F, Yang T, Lu YW, Geng YJ. *MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction*. Biochem Biophys Res Commun 2009;381: 81–83.
- 153.-** Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Rosso A, Brizzi MF. *Mir221/mir222-driven post-transcriptional regulation of p27kip1 and p57kip2 is crucial for high glucose and age-mediated vascular cell damage*. Diabetologia 2011;54:1930 – 1940.
- 154.-** Caporali A, Meloni M, Vollenkle C, Bonci D, Sala-Newby GB, Addis R, Spinetti G, Losa S, Masson R, Baker AH, Agami R, le Sage C, Condorelli G, Madeddu P, Martelli F, Emanuelli C. *Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia*. Circulation 2011;123:282 – 291.
- 155.-** Meng S, Cao JT, Zhang B, Zhou Q, Shen CX, Wang CQ. *Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene SPRED-1*. J Mol Cell Cardiol 2012;53:64 – 72.
- 156.-** Wang DE. *MicroRNA regulation and its biological significance in personalized medicine and aging*. Curr Genomics 2009;10:143.
- 157.-** Thornton P, Douglas J. *Coagulation in pregnancy*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2010;24:339–52.
- 158.-** Achneck HE, Sileshi B, Parikh A, Milano CA, Welsby IJ, Lawson JH. *Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface*. Circulation. 2010;122:2068–77.
- 159.-** Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. *Risk factors for venous and arterial thrombosis*. Blood Transfus. 2011;9:120–38.

- 160.-** Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.* Blood. 1998;91:3527–61.
- 161.-** Triplett DA. *Coagulation and bleeding disorders: Review and update.* Clin Chem. 2000;46:1260–9.
- 162.-** Andrews RK, Berndt MC. *Platelet physiology and thrombosis.* Thromb Res. 2004;114:447–53.
- 163.-** Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. *Anticoagulant properties of the vascular endothelium.* Thromb Haemost. 1997 Mar;77(3):408-23.
- 164.-** Lasne D, Jude B, Susen S. *From normal to pathological hemostasis.* Can J Anesth. 2006;53:S2–11.
- 165.-** Owens AP, Mackman N. *Tissue factor and thrombosis: The clot starts here.* Thromb Haemost. 2010;104:432–9.
- 166.-** Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2010. Hemodynamic disorders, thromboembolic disease and shock; pp. 118–20.
- 167.-** Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: Enhanced E-Book. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2010. Hemostasis and blood coagulation; pp. 457–9.
- 168.-** Sanjeev Palta, Richa Saroa, and Anshu Palta. *Overview of the coagulation system.* Indian J Anaesth. 2014 Sep-Oct; 58(5): 515–523.
- 169.-** Papapetropoulos A, Piccardoni P, Cirino G, Bucci M, Sorrentino R, Cicala C, Johnson K, Zachariou V, Sessa WC, Altieri DC. *Hypotension and inflammatory cytokine gene expression triggered by factor Xa-nitric oxide signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Apr 14;95(8):4738-42.

- 170.- Schaeffer P, Mares AM, Dol F, Bono F, Herbert JM. *Coagulation factor Xa induces endothelium-dependent relaxations in rat aorta*. Circ Res. 1997 Nov;81(5):824-8.
- 171.- Borensztajn K, Spek CA. *Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target*. Expert Opin Ther Targets 2011;15:341–349.
- 172.- Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. *Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease*. Trends Mol Med 2008;14:429 – 440.
- 173.- Borissoff JJ, Heeneman S, Kilinc E, Kassa'k P, Van Oerle R, Winckers K et al. *Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state*. Circulation 2010;122:821–830.
- 174.- Koo BH, Kim DS. *Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of epiregulin*. J Biol Chem 2003;278:52578–52586.
- 175.- Blanc-Brude OP1, Archer F, Leoni P, Derian C, Bolsover S, Laurent GJ, Chambers RC. *Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation*. Exp Cell Res. 2005 Mar 10;304(1):16-27.
- 176.- Bono M, P Schaeffer, Héroult JP, Michaux C, Néstor AL, Guillemot JC et al. *Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:107-112.
- 177.- Henri M.H. Spronk1, Anne Margreet de Jong, Harry J. Crijns, Ulrich Schotten, Isabelle C. Van Gelder, and Hugo ten Cate. *Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants*. Cardiovascular Research. 2014;101:344–351
- 178.- Busch G, Seitz I, Steppich B, Hess S, R Eckl, Schömig A et al. *Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear*

leukocytes: implications in acute myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:46-6.

179.- Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoort R, van't Veer C, Hemker HC, Buurman WA. *Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells*. J Immunol. 1998;161(8):4318-24.

180.- Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer KH, Straub A. *In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939 an oral, direct Factor Xa inhibitor*. J Thromb Haemost. 2005; 3: 514–521.

181.- Tersteegen A, Schmidt S, Burkhardt N. *Rivaroxaban an oral, direct Factor Xa inhibitor binds rapidly to Factor Xa*. J Thromb Haemost. 2007; 5 (Suppl 2): Abstract P-W-651.

182.- Ansell J. *Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target?* J Thromb Haemost. 2007; 5 (Suppl 1): 60–64.

183.- American Society of Health-System Pharmacists [Internet]. Bethesda, MD. 2013 (citado en 2015). Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivaroxaban#section=Top>

184.- European Medicines Agency (EMA). CHMP Assessment Report for Xarelto [Internet]. 2013 (citado en 2015). Disponible en: <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/xarelto/H-944-en6.pdf>

185.- EINSTEIN Investigators. *Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism*. N Engl J Med. 2010;363(26):2499–2510.

186.- Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, et al. ROCKET AF Investigators. *Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation*. N Engl J Med. 2011;365(10):883–891.

- 187.-** Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Bruns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM. *Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome(ATLAS ACS 2-TIMI 51)*. N Engl J Med 2012;366:9–19.
- 188.-** US Natl Inst Health; DailyMed. Current Medication Information for XARELTO (rivaroxaban). [Internet]. 2013 (citado en 2015). Disponible en: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=10db92f9-2300-4a80-836b-673e1ae91610>
- 189.-** Weitz JI, Hirsh J, Samama MM. *New antithrombotic drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, 8th Edition*. Chest. 2008; 133: 234S–256S.
- 190.-** Kubitza D, Becka M, Voith B, Zuehlendorf M, Wensing G. *Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor*. Clin Pharmacol Ther. 2005; 78: 412–421.
- 191.-** Kubitza D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlendorf M. *Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—after multiple dosing in healthy male subjects*. Eur J Clin Pharmacol. 2005; 61: 873–880.
- 192.-** Weinz C, Schwarz T, Kubitza D, Mueck W, Lang D. *Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor, in rats, dogs and humans*. Drug Metab Dispos. 2009; 37: 1056–1064.
- 193.-** Lang D, Freudenberger C, Weinz C. *In vitro metabolism of rivaroxaban—an oral, direct Factor Xa inhibitor—in liver microsomes and hepatocytes of rat, dog and man*. Drug Metab Dispos. 2009; 37: 1046–1055.

- 194.-** Gong IY et al. *Absence of both MDRI (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) transporters significantly alters rivaroxaban disposition and central nervous system entry.* Basic Clin Pharmacol Toxicol 2013;112 (3): 164-70.
- 195.-** Anderson L, Seilhamer J. *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver.* Electrophoresis 1997;18:533-7.
- 196.-** Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.* Mol Cell Biol 1999;19:1720-30.
- 197.-** Maithal K. *Proteomics—a new player in the post-genomic era.* Indian J Biochem Biophys 2002; 39:291-302.
- 198.-** Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.* Electrophoresis 2000;21:1037-53.
- 199.-** Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.* Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9390-5.
- 200.-** Kenrick KG, Margolis J. *Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two dimensional technique.* Anal Biochem. 1970;33:204-7.
- 201.-** Klose J. *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.* Humangenetik 1975;26:231-43.
- 202.-** O'Farrell PH. *High resolution two- dimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem 1975;250:4007-21.
- 203.-** Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications.* J Biochem Biophys Methods 1982;6:317-39.

- 204.-** Gorg A, Postel W, Gunther S. *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis 1988;9:531-46.
- 205.-** Marouga R, David S, Hawkins E. *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. Anal Bioanal Chem 2005;382:669-78.
- 206.-** Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis 1988;9:255-62.
- 207.-** Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. *Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view*. Electrophoresis 2006;27:1574-83.
- 208.-** Rabilloud T. *Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis*. Electrophoresis 1990;11:785-94.
- 209.-** Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annu Rev Biochem 2001;70:437-73.
- 210.-** Aebersold R, Mann M. *Mass spectrometry- based proteomics*. Nature 2003;422:198-207.
- 211.-** Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 1989;246:64-71.
- 212.-** Karas M, Hillenkamp F. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem 1988;60:2299-301.
- 213.-** Aebersold R, Goodlett DR. *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev 2001;101:269-95.

- 214.- Guerrero IC, Kleiner O. *Application of mass spectrometry in proteomics*. Biosci Rep 2005;25:71-93.
- 215.- Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Petersen S, Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. Eur Heart J 2006;27:1610-9.
- 216.- Mensah GA, Brown DW. *An overview of cardiovascular disease burden in the United States*. Health Aff (Millwood) 2007;26:38-48.
- 217.- Cieniewski-Bernard C, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M et al. *Proteomic analysis in cardiovascular diseases*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008;35:362-6.
- 218.- Balestrieri ML, Giovane A, Mancini FP, Napoli C. *Proteomics and cardiovascular disease: an update*. Curr Med Chem 2008;15:555-72.
- 219.- Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Aponte AM, Makusky AJ et al. *Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver*. Electrophoresis 2000;21:2129-37.
- 220.- Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath Am, Seonarain MD, Makusky AJ et al. *Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin*. Toxicol Lett 2001;120:369-77.
- 221.- Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D et al. *Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients*. J Proteome Res 2006;5:2301-8.
- 222.- De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Cats VM, Orth-Gomér K, Perk J, Pyörälä K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D; European Society of Cardiology. American Heart Association. American College of Cardiology. *European guidelines on cardiovascular disease prevention in*

- clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). Atherosclerosis. 2004 Apr;173(2):381-91.*
- 223.-** Moore GE, Woods LK. *Culture media for human cells- RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 y GEM 1717. TCA manual 1977;3:503-9.*
- 224.-** Haas S. *Rivaroxaban -- an oral, direct Factor Xa inhibitor: lessons from a broad clinical study programme. Eur J Haematol. 2009 May;82(5):339-49.*
- 225.-** Kubitza D, Becka M, Zuehlendorf M, Mueck W. *Effect of food, an antacid, and the H2 antagonist ranitidine on the absorption of BAY 59-7939 (rivaroxaban), an oral, direct factor Xa inhibitor, in healthy subjects. J Clin Pharmacol. 2006 May;46(5):549-58.*
- 226.-** Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. *Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985;150:76-85.*
- 227.-** Molero L, García-Méndez A, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Macaya C, López-Farré AJ. *Proteomic approach to identify changes in protein expression modified by 17beta-oestradiol in bovine vascular smooth muscle cells. Clin Sci 2005;109:457-63.*
- 228.-** Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D et al. *Proteomic study of plasma from moderate hypercholestrolemic patients. J Proteome Res 2006;5:2301-8.*
- 229.-** Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, Alonso-Orgaz S et al. *Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. J Am Coll Cardiol 2004;44:1578-1583.*
- 230.-** McGregor E, Kempster L, Wait R, Welson SY, Gosling M, Dunn MJ et al. *Identification and mapping of human saphenous vein medial smooth muscle proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Proteomics 2001;1:1405-14.*

- 231.-** Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Thérout P, Van de Werf F et al. *Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials*. Lancet 2002;359:189-98.
- 232.-** Deckelaum Li, SF (ed.). *Tirofiban, a nonpeptido inhibitor of the platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor*. Marcel Decker, New York, 1997.
- 233.-** Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, Alonso-Orgaz S et al. *Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome*. J Am Coll Cardiol 2004;44:1578-1583.
- 234.-** López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, García-Colis E, Gomez J, López-Blaya A, Fortes J et al. *Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the α_1 -receptor blocker doxazosin*. J Hypertens 2002;20:463-70.
- 235.-** Forbes JM1, Cooper ME. *Mechanisms of diabetic complications*. Physiol Rev. 2013 Jan;93(1):137-88.
- 236.-** .Hall JL1, Matter CM, Wang X, Gibbons GH. *Hyperglycemia inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis through a protein kinase C-dependent pathway*. Circ Res. 2000 Sep 29;87(7):574-80.
- 237.-** Chilelli NC1, Burlina S, Lapolla A. *AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycoxidation-centric" point of view*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2013 Oct;23(10):913-9.
- 238.-** Dayer MR, Mard-Soltani M, Dayer MS, Alavi SM. *Causality relationships between coagulation factors in type 2 diabetes mellitus: path analysis approach*. Med J Islam Repub Iran. 2014 Jul 13;28:59.

- 239.-** Bono F, Herault JP, Avril C, Schaeffer P, Lormeau JC, Herbert JM. *Human umbilical vein endothelial cells express high affinity receptors for factor Xa*. J Cell Physiol. 1997 Jul;172(1):36-43.
- 240.-** Petersen KF¹, Price TB, Bergeron R. *Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: impact of type 1 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Sep;89(9):4656-64.
- 241.-** Vranic M. *Odyssey between Scylla and Charybdis through storms of carbohydrate metabolism and diabetes: a career retrospective*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010 Dec;299(6):E849-67.
- 242.-** Boden G. *Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus*. Proc Assoc Am Physicians. 1999 May-Jun;111(3):241-8.
- 243.-** Kelley DE, Simoneau JA. *Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest. 1994 Dec;94(6):2349-56.
- 244.-** Gaster M, Nehlin JO, Minet AD. *Impaired TCA cycle flux in mitochondria in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects: marker or maker of the diabetic phenotype?* Arch Physiol Biochem. 2012 Jul;118(3):156-89.
- 245.-** Gaster M. *A primary reduced TCA flux governs substrate oxidation in T2D skeletal muscle*. Curr Diabetes Rev. 2012 Nov;8(6):458-79.
- 246.-** Wyss M, Kaddurah-Daouk R. *Creatine and creatinine metabolism*. Physiol Rev. 2000 Jul;80(3):1107-213.
- 247.-** Brooks C, Wei Q, Cho SG, Dong Z. *Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models*. J Clin Invest 2009;119:1275-85.
- 248.-** Tan AL, Sourris KC, Harcourt BE, Thallas-Bonke V, Penfold S, Andrikopoulos S, Thomas MC, O'Brien RC, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM, Coughlan MT. *Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE*

accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol 2010; 298: F763–F770.

249.- Magenta A, Greco S, Capogrossi MC, Gaetano C, Martelli F. *Nitric oxide, oxidative stress, and p66Shc interplay in diabetic endothelial dysfunction.* Biomed Res Int. 2014;2014:193-95.

250.- Chang YC, Chuang LM. *The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication.* Am J Transl Res. 2010 Jun 10;2(3):316-31.

251.- Niedowicz DM, Daleke DL. *The role of oxidative stress in diabetic complications.* Cell Biochem Biophys. 2005;43(2):289-330.

252.- Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D and Grune T. *Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus.* Biomolecules 2015;5:194-222.

253.- Maiese K. *New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus.* Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:875961.

254.- Cariello M, Simone S, Loverre A, Gigante M, Incampo F, Pietanza S, Colucci M, Schena FP, Gesualdo L, Grandaliano G, Pertosa G. *Coagulation activation is associated with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent reactive oxygen species generation in hemodialysis patients.* Antioxid Redox Signal. 2012;16(5):428-39.

255.- Esmon CT. *Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond.* Thromb Haemost. 2014 Apr 1;111(4):625-33.

256.- Böhm A1, Flößer A, Ermler S, Fender AC, Lüth A, Kleuser B, Schrör K, Rauch BH. *Factor-Xa-induced mitogenesis and migration require sphingosine kinase activity and SIP formation in human vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res. 2013 Aug 1;99(3):505-13.

- 257.-** Spronk HM1, de Jong AM, Crijns HJ, Schotten U, Van Gelder IC, Ten Cate H. *Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants.* Cardiovasc Res. 2014 Mar 1;101(3):344-51.
- 258.-** Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. *The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis.* N Engl J Med 2011; 364: 1746–1760.
- 259.-** Coughlin SR. *Thrombin signalling and protease-activated receptors.* Nature 2000; 407: 258–264.
- 260.-** Jobi K, Rauch BH, Dangwal S, Freidel K, Doller A, Eberhardt W, Fischer JW, Schrör K, Rosenkranz AC. *Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X.* Free Radic Biol Med. 2011 Nov 1;51(9):1758-64.
- 261.-** Caliskan A1, Yavuz C, Karahan O, Yazici S, Guclu O, Demirtas S, Mavitas B. *Factor-Xa inhibitors protect against systemic oxidant damage induced by peripheral-ischemia reperfusion.* J Thromb Thrombolysis. 2014 May;37(4):464-8.
- 262.-** Ushio-Fukai M, Zafari A.M, Fukui T, Ishizaka N, Griendling K.K. *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells.* J. Biol. Chem. 1996;271:23317–23321.
- 263.-** Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman B.A, Griendling K.K, Harrison D.G. *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone.* J. Clin. Invest. 1996;97:1916–1923.
- 264.-** Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen J.H, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. *Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system.* Circulation.

1999;99:2027-2033.

265.- San Martin A, Griendling KK. *NADPH oxidases: progress and opportunities.* Antioxid. Redox Signal. 2014;20:2692-94.

266.- Kawabata A, Kuroda R, Nakaya Y, Kawai K, Nishikawa H, Kawao N. *Factor Xa-evoked relaxation in rat aorta: involvement of PAR-2.* Biochem Biophys Res Commun. 2001 Mar 30;282(2):432-5.

267.- Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Sindhu RK. *Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension.* Kidney Int. 2003 Jan;63(1):186-94.

268.- Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G. *Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects.* Clin. Chem. 2003;47 (8): 1467–1469.

269.- Warburg O. *On the origin of cancer cells.* Science. 1956;123:309-14.

270.- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J et al. *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.* Nat Genet. 2003;34:267-73.

271.- Kumashiro N, Tamura Y, Uchida T, Ogihara T, Fujitani Y, Hirose T et al. *Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in hepatic insulin resistance.* Diabetes 2008;57:2083-91.

272.- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. *PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells.* Cardiovasc Res. 2005;66:562-73.

273.- Addabbo F, Ratliff B, Park HC, Kuo MC, Ungvari Z, Csiszar A et al. *The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach.* Am J Pathol. 2009;174: 34-43.

- 274.-** Ambrosini G, Altieri DC. *Molecular dissection of effector cell protease receptor-1 recognition of factor Xa. Assignment of critical residues involved in antibody reactivity and ligand binding.* J Biol Chem. 1996 Jan 12;271(2):1243-8.
- 275.-** Zhou Q1, Bea F, Preusch M, Wang H, Isermann B, Shahzad K, Katus HA, Blessing E. *Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral factor Xa inhibitor rivaroxaban.* Mediators Inflamm. 2011;2011:432-80.
- 276.-** Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. *Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice.* Atherosclerosis. 2015;S0021-9150(15)00183-5.
- 277.-** Wu TC, Chan JS, Lee CY, Leu HB, Huang PH, Chen JS, Lin SJ, Chen JW. *Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, improves neovascularization in the ischemic hindlimb of streptozotocin-induced diabetic mice.* Cardiovasc Diabetol. 2015 Jun 16;14:81.
- 278.-** Gibson CM1, Chakrabarti AK, Mega J, Bode C, Bassand JP, Verheugt FW, Bhatt DL, Goto S, Cohen M, Mohanavelu S, Burton P, Stone G, Braunwald E; *ATLAS-ACS 2 TIMI 51 Investigators.* *Reduction of stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with rivaroxaban in ATLAS-ACS 2 TIMI 51.* J Am Coll Cardiol. 2013 Jul 23;62(4):286-90.
- 279.-** Zannad F, Greenberg B, Cleland JG, Gheorghiade M, van Veldhuisen DJ, Mehra MR, Anker SD, Byra WM, Fu M, Mills RM. *Rationale and design of a randomized, double-blind, event-driven, multicentre study comparing the efficacy and safety of oral rivaroxaban with placebo for reducing the risk of death, myocardial infarction or stroke in subjects with heart failure and significant coronary artery disease following an*

exacerbation of heart failure: the COMMANDER HF trial. Eur J Heart Fail. 2015 Jul;17(7):735-42.

9

APÉNDICES

APÉNDICE

A

Introducción y objetivo: más allá de su papel fundamental en la hemostasia, el factor Xa (FXa) provoca efectos sobre la pared vascular. El propósito de esta tesis fue evaluar si FXa modifica el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético y el estrés oxidativo en las arterias femorales obtenidas de pacientes diabéticos tipo 2. **Materiales y métodos:** las arterias femorales se obtuvieron de 12 pacientes diabéticos tipo 2. Los segmentos de las arterias femorales fueron incubados in vitro de forma aislada, y en presencia de 25 nmol / L de FXa y 25 nmol / L de FXa + 50 nmol / L rivaroxabán. **Resultados principales:** en las arterias femorales, FXa aumentó la expresión de isomerasa triosafosfato y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isotipo 1, pero disminuyó la expresión de piruvato deshidrogenasa, acompañándose de un aumento del contenido de acetil-CoA. La actividad de la aconitasa se redujo en las arterias femorales incubadas con FXa en comparación con el control. Por otra parte, el nivel de expresión de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo se incrementó en la incubación con FXa. El inhibidor de FXa, rivaroxabán, no pudo evitar la reducción de la expresión de piruvato deshidrogenasa inducida por FXa pero redujo el contenido de acetil-CoA y revirtió la disminución de actividad aconitasa observada con solo FXa. En los cultivos de rivaroxabán + FXa pero no FXa solo, aumentó el nivel de expresión de la carnitina palmitoiltransferasa I y II, dos transportadores mitocondriales de ácidos grasos de cadena larga. Rivaroxabán también impidió el aumento de la expresión de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo inducido por FXa aislado. **Conclusiones:** la incubación de segmentos de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos con el factor de coagulación Xa produce un aumento significativo de la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo glucolítico, que son la triosafosfato isomerasa y la isoforma 1 de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, lo que sugeriría un aumento de la glucolisis;

además, la incubación de segmentos de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos con el factor Xa produce un aumento significativo de la vía de la creatina quinasa, que es una vía alternativa de obtención de energía, fundamentalmente cuando es complicado utilizar otras vías metabólicas; por otro lado, el factor Xa no produce modificaciones en la actividad de la beta-oxidación de ácidos grasos, ni tampoco en el ciclo de Krebs, en los segmentos incubados de arteria femoral superficial arterioesclerótica de pacientes diabéticos, pero sí produce un aumento de la glutatión S-transferasa. El aumento en la expresión de esta enzima podría ocurrir como respuesta compensadora a un posible aumento de la formación de radicales libres por la presencia de factor Xa; y, por último, el Rivaroxabán previene todos estos efectos producidos por el factor Xa y, además, produce un aumento por sí mismo de la carnitina palmitoiltransferasa I y II, lo que facilitaría la incorporación de los ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria facilitando su metabolismo, lo que podría suponer un efecto beneficioso adicional para la pared arterial de pacientes diabéticos con arterioesclerosis. En conjunto, los datos presentados en esta Tesis Doctoral muestran que el factor Xa presenta una funcionalidad que probablemente no se circunscriba exclusivamente a su papel en la cascada de la coagulación.

APÉNDICE

B

Background and purpose: Further to its pivotal role in hemostasis, factor Xa (FXa) elicits effects on the vascular wall. The purpose of this thesis was to evaluate if FXa modifies the expression level of proteins related to energy metabolism and oxidative stress in femoral arteries obtained from type-2 diabetic patients.

Experimental approach: Supercicial femoral arteries (SFA) were obtained from 12 type-2 diabetic patients. Segments from the femoral arteries were in vitro incubated alone and in the presence of 25 nmol/L FXa and 25 nmol/L FXa+ 50 nmol/L Rivaroxaban.

Key results: In the SFA, FXa increased triosephosphate isomerase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isotype 1 expression but decreased pyruvate dehydrogenase expression and it was accompanied by an increased content of acetyl-CoA. Aconitase activity was reduced in FXa-incubated femoral arteries as compared with control. Moreover, protein expression level of oxidative stress-related proteins was increased by FXa. The FXa inhibitor, Rivaroxaban, failed to prevent the reduced expression of pyruvate dehydrogenase induced by FXa but reduced acetyl-CoA content and reverted the decreased aconitase activity observed with FXa alone. Rivaroxaban + FXa but not FXa alone increased the expression level of carnitine palmitoyltransferase I and II, two mitochondrial long-chain fatty acid transporters. Rivaroxaban also prevented the increased expression of oxidative stress-related proteins induced by FXa alone.

Conclusions and implications: the incubation of atherosclerotic segments of SFA from diabetic patients with FXa leads to a significant increase in the enzymes expression related to the glucolytic metabolism, which are the triosephosphate isomerase and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isotype 1, which would suggest a glycolysis increase; furthermore, the atherosclerotic SFA segments incubation from diabetic patients with FXa, produces a significant increase of creatine kinase pathway, which is an alternative energy obtaining mechanism, when the

use of others is complicated. Neither FXa produces fatty acids betaoxidation modifications, nor in Krebs cycle, but does produce a glutathione S transferase increase. This enzyme expression increment could be as a compensatory response due to a rise in the free radical formation regarding to FXa presence; rivaroxaban prevents all such effects produced by FXa, and indeed produces a carnitine palmitoyltransferase I and II elevation, which would enhance the long chain fatty acid incorporation into the mitochondria for its metabolism; this would mean an additional beneficial effect to atherosclerotic diabetic patients. In summary, the data presented in the present Doctoral Thesis show how FXa activity have probably not just a role subscribed to coagulation pathway.

APÉNDICE

C

C. ABREVIATURAS

2-DE: Electroforesis bidimensional

AA: Ácido araquidónico

ACD: Ácido citrato dextrosa

ADH_m: Aldehído deshidrogenasa mitocondrial

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosín trifosfato

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero bovino

CD40L: CD40 ligado

CE: Célula endotelial

CHAPS: 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propenosulfonato

CML: Célula de músculo liso

CPTI: Carnitina palmitoiltransferasa I

CPTII: Carnitina palmitoiltransferasa II

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa endotelial

EO: Estrés oxidativo

F6P: Fructosa 6 fosfato

FT: Factor tisular

FXa: Factor de coagulación Xa

G3P: Gliceraldehído 3 fosfato

G3PDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

G6P: Glucosa 6 fosfato

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

GP Ib: Glicoproteína Ib plaquetaria

GP IIb/IIIa: Glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria

ICAM: Molécula de adhesión intercelular-1

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1: Interleuquina-1

IL-6: Interleuquina-6

IL-8: Interleuquina-8

IL-10: Interleuquina-10

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

IPG: Gradiente de pH inmovilizado

I κ B: Inhibidor kappa beta

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDL_{ox}: Lipoproteínas oxidadas de baja densidad

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1

M-CSF: Factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos

MMP: Metaloproteinasas de matriz

MS: Espectrometría de masas

NAD: Nicotinamida adenín dinucleótido

NADH: Nicotinamida adenín dinucleótido reducido

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa beta

NO: Óxido nítrico

PBS: Tampón fosfato-salino

PCR: Proteína C reactiva

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PLT: Plaquetas

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SDS-PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS

SFB: Suero fetal bovino

TBS-T: *Tris-Buffered saline Tween-20*

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TOF: *Time of flight*

TPI: Triosa fosfato isomerasa

TxA₂: Tromboxano A₂

UAD: Unidades arbitrarias de densitometría

VCAM-1: Molécula 1 de adhesión vascular

vWF: Factor de *von Willebrand*

WB: *Western blot*

w/v: Weigth/volume

*“Obra siempre según una máxima tal, que quieras al mismo
tiempo que se torne en ley universal”*

Immanuel Kant